

Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. T. Pohlemann
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Blockade des ‚Angiotensin-Converting‘-Enzyms – Auswirkungen auf die Frakturheilung in der Maus

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2011

vorgelegt von
Sabrina Schwenzer
(geb. Maier)

geboren am 03.11.1982 in Ulm

meinem Ehemann gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	6
2. SUMMARY	8
3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
4. EINLEITUNG	13
4.1. Fraktur und Frakturheilung	14
4.1.1. Primäre Frakturheilung	14
4.1.2. Sekundäre Frakturheilung	15
4.1.3. Zeitliche und regionale Abfolge der sekundären Frakturheilung	16
4.1.4. Einflüsse von Angiogenese, Weichteilschaden und Inflammation	17
4.2. Renin-Angiotensin-System	19
4.2.1. Systemisches RAS	19
4.2.2. Lokales RAS	20
4.2.3. Bradykinin	22
4.2.4. ACE-Blockade	22
4.3. RAS und Frakturheilung	24
4.4. Ziele der Arbeit	25
5. MATERIAL UND METHODIK	26
5.1. Tiere und Tierhaltung	26
5.2. Vorversuche	26
5.2.1. Ermittlung der Trinkmenge der Versuchstiere	26
5.2.2. Perindopril-Lösung	26
5.2.3. Trinkversuch mit der Perindopril-Lösung	27
5.3. Studiendesign	27
5.4. Operation	28
5.4.1. Anästhesie und Operationsvorbereitung	28
5.4.2. Frakturmodell	29
5.4.3. OP-Technik	30
5.5. Versuchsabschluss	32
5.6. Auswertungsverfahren	33
5.6.1. Gewicht, Blutdruck und Herzfrequenz	33
5.6.2. Konventionelle Radiologie	33
5.6.3. Biomechanik	34

5.6.4. Histologie und Immunhistochemie	35
5.6.5. Mikrocomputertomographie	38
5.6.6. Western-Blot	39
5.6.7. ELISA	45
5.7. Statistik	46
6. ERGEBNISSE	47
6.1. Perioperative Komplikationen	47
6.2. Gewicht, Blutdruck und Herzfrequenz	47
6.3. Konventionelle Radiologie	48
6.3.1. Kallus-/Femurdurchmesser der radiologischen Auswertung	48
6.3.2. Goldberg-Klassifikation	50
6.4. Biomechanik	51
6.4.1. Maximales Drehmoment	51
6.4.2. Torsionswinkel an der Stelle des maximalen Drehmoments	52
6.4.3. Torsionssteifigkeit	53
6.5. Histologie und Immunhistochemie	54
6.5.1. Frakturspaltbreite der histologischen Auswertung	54
6.5.2. Kallus-/Femurdurchmesser der histologischen Auswertung	54
6.5.3. Periostale Kallusfläche	55
6.5.4. Gewebezusammensetzung im Kallus	56
6.5.5. Histologie-Score	59
6.5.6. ACE	60
6.5.7. Vaskularisierung	61
6.6. Mikrocomputertomographie	62
6.7. Western-Blot	63
6.7.1. Expression von Komponenten des RAS während der Frakturheilung	63
6.7.2. Expression von proangiogenen Faktoren	65
6.7.3. Expression von Markern für Proliferation und Apoptose	66
6.8. Parathormonkonzentration im Blut	67
7. DISKUSSION	68
7.1. Diskussion des Modells	68
7.2. RAS und Knochen	70
7.3. RAS und Frakturheilung	72
7.3.1. Lokales RAS und Frakturheilung	72

7.3.2. RAS, Proliferation und Apoptose.....	76
7.3.3. RAS und Angiogenese.....	77
7.3.4. Zusammenhang zwischen RAS, Blutdruck und Frakturheilung.....	78
7.3.5. RAS und Inflammation.....	80
7.3.6. RAS und Kalziummetabolismus.....	80
7.4. Schlussfolgerung.....	82
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	83
9. DANKSAGUNG.....	94
10. LEBENSLAUF.....	95
11. PUBLIKATIONEN.....	97
11.1. Originalarbeiten.....	97
11.2. Kongressbeiträge und Abstracts.....	97
11.2.1. Vorträge.....	97
11.2.2. Posterpräsentation.....	98

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Renin-Angiotensin-System ist eine Kaskade von verschiedenen Hormonen und Enzymen zur systemischen Regulation des Blutdrucks und des Flüssigkeitshaushaltes mit Angiotensin II als wichtigstem Effektormolekül. Im Gegensatz zum systemischen Renin-Angiotensin-System wurde in den letzten Jahren in vielen Organen wie Herz, Niere etc. ein lokales Renin-Angiotensin-System nachgewiesen, welches Zellregeneration, Zellwachstum, Apoptose, Entzündungsreaktionen und die Gefäßbildung beeinflusst. Über ein lokales Renin-Angiotensin-System im Knochen ist bis dato noch kaum etwas bekannt. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Renin-Angiotensin-System und Knochen geben klinische Studien, in denen gezeigt wurde, dass die Blockade des ‚Angiotensin-Converting‘-Enzyms zu einem geringeren Frakturrisiko und einer höheren Knochendichte führt. Neuere Studien haben des Weiteren die Expression verschiedener Bestandteile des Renin-Angiotensin-Systems im Knochen der Ratte gezeigt, welche auf ein funktionelles lokales Renin-Angiotensin-System im Knochen schließen lassen. Welche Rolle ein lokales Renin-Angiotensin-System im Knochen und während der Frakturheilung spielt, und ob hierdurch ähnlich wie in anderen Organen die Geweberegeneration beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

Das Ziel der Studie galt der Beantwortung der Fragen, ob ein lokales Renin-Angiotensin-System im Frakturkallus existiert und welchen Einfluss es auf den Heilungsprozess hat. Hierzu wurden CD-1-Mäuse am rechten Femur osteotomiert, stabilisiert und anschließend mit dem ‚Angiotensin-Converting‘-Enzym-Hemmer Perindopril bzw. Placebo behandelt. Die Frakturheilung wurde 2, 5 und 10 Wochen nach der Osteotomie biomechanisch, histomorphometrisch, immunhistochemisch und radiologisch mittels Röntgen und Mikrocomputertomographie untersucht. Die Expression bestimmter Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems erfolgte im Kallusgewebe mittels Western-Blot und im Serum mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen konnten wir zeigen, dass das ‚Angiotensin-Converting‘-Enzym im normalen Knochen während der enchondralen Knochenbildung in der Wachstumsplatte, jedoch nicht im adulten lamellären

Knochen exprimiert wird. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Inhibition des ‚Angiotensin-Converting‘-Enzyms den Knochen funktionell beeinflusste, indem es die Knochendichte in der distalen Femurmetaphyse am unfrakturierten Knochen verminderte.

Wir konnten außerdem zum ersten Mal die Expression des ‚Angiotensin-Converting‘-Enzyms, der Angiotensin II Typ 1- und Typ 2-Rezeptoren des Renin-Angiotensin-Systems im Kallus während der Frakturheilung nachweisen. Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung konnte der Ort der ‚Angiotensin-Converting‘-Enzym-Expression in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten im Kallusgewebe lokalisiert werden. Die Blockade des ‚Angiotensin-Converting‘-Enzyms verbesserte die frühe Phase der Frakturheilung, indem es die Kallusbildung steigerte. Dies zeigte sich in einer vermehrten enchondralen Kallusbildung mit erhöhtem Anteil an Knorpelgewebe in Perindopril-behandelten Tieren nach 2 Wochen. Dies ging mit einer größeren Steifigkeit und einem erhöhten Drehmoment am Punkt des Versagens in der biomechanischen Auswertung einher. In der späten Phase der Frakturheilung, nach 10 Wochen, unterschieden sich die Ergebnisse der biomechanischen und histomorphometrischen Auswertung nicht mehr. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Frakturen sowohl mit, als auch ohne Perindopril- Behandlung knöchern durchbaut. Allerdings zeigte die radiologische Auswertung nach 10 Wochen einen kleineren Kallusdurchmesser in den Röntgenbildern und ein geringeres Knochenvolumen des Frakturkallus in der Mikrocomputertomographie. Dies ist durch einen fortgeschrittenen Remodellingprozess unter ‚Angiotensin-Converting‘-Enzym-Blockade zu erklären.

Unsere Ergebnisse deuten auf die Existenz eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems während der Frakturheilung hin, welches den Heilungsprozess nachweislich beeinflusst.

2. SUMMARY

The renin-angiotensin system is a cascade of hormones and enzymes regulating systemic blood pressure and fluid homeostasis with angiotensin II as the main effector molecule. In contrast to the systemic renin-angiotensin system, in the last years a local renin-angiotensin system has been identified in many organs like heart, kidney etc., influencing cell regeneration, cell growth, apoptosis, inflammation and angiogenesis. There is sparse knowledge about a local renin-angiotensin system in bone. Clinical studies have indicated that blockade of angiotensin-converting enzyme is associated with a lower fracture risk and with a higher bone mineral density. Recently, a study showed expression of different components of the renin-angiotensin system in the rat bone indicating the presence of a local renin-angiotensin system in bone. The role of a local renin-angiotensin system in bone, during fracture healing and whether it is able to influence bone regeneration is unknown.

The aim of this study was to answer the questions if there is a local renin-angiotensin system in the fracture callus and how a local renin-angiotensin system influences the fracture healing process. Therefore, we used stabilized osteotomies of the right femora of CD-1-mice and we treated them subsequently with the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril or vehicle. Fracture healing was analysed 2, 5 and 10 weeks after osteotomy using biomechanical, histomorphometric, immunohistochemical, radiological analyses and microcomputertomography. The expression of components of the renin-angiotensin system was analysed in the callus by western blot analysis and in serum by enzyme linked immunosorbent assay techniques.

Immunohistochemical analysis showed expression of angiotensin-converting enzyme during enchondral bone formation by osteoblasts in the growth plate of the proximal femur. However, we did not observe expression of angiotensin-converting enzyme in osteocytes in lamellar bone. Furthermore, we could show that inhibition of angiotensin-converting enzyme influences normal bone reducing bone mineral density in the distal femoral metaphysis of unfractured bone.

For the first time we showed the expression of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 and type 2 receptor, as components of renin-angiotensin system in the callus during fracture healing. Using immunohistochemistry, we could localize angiotensin-converting enzyme expression in hypertrophic chondrocytes and osteoblasts of callus tissue. Blockade of the angiotensin-converting enzyme affected the early stage of fracture healing enhancing callus formation. This was shown by an increased enchondral callus formation with higher cartilage proportion in callus tissue in perindopril treated animals after 2 weeks compared to controls. A higher stiffness and greater torque of failure after 2 weeks in the perindopril-group were the corresponding findings in the biomechanical testing. After 10 weeks of fracture healing, the results in the biomechanical and histological analyses didn't show any differences. At that time, all fractures showed complete bone bridging with and without perindopril treatment. However after 10 weeks, the radiological analyses showed a smaller callus diameter and decreased callus volume in the microcomputertomography analyses demonstrating an advanced callus remodeling under treatment with perindopril.

Our findings point to the existence of a local renin-angiotensin system in fracture healing.

3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A.	Arteria
A. dest	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ACE	„angiotensin-converting“-Enzym
ACE-I	„angiotensin-converting enzyme inhibitor“ („Angiotensin-Converting“-Enzym-Inhibitor)
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AT ₁ -R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT ₂ -R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
Bg	Bindegewebe
BMD _{all}	„Bone mass density“ (Knochendichte) im gesamten Kallusquerschnitt
BMD _{trab}	„Bone mass density“ (Knochendichte) im spongiösen Kallusquerschnitt
BMD _{trab50%}	„Bone mass density“ (Knochendichte) in den inneren 50% des spongiösen Kallusquerschnitts
BV _{cal}	„Bone Volume“ (Knochenvolumen) im Frakturkallus
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	„Cluster of Differentiation“
CT	Computertomographie
cm	Zentimeter
DANN	Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
dl	Deziliter
EDTA	Ethyldiaminessigsäure
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“ (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
et al.	et alii
etc.	et cetera
G	Gauge
g	Gramm

Gk	Geflechtknochen
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPF	„high power field“
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettichperoxidase)
iNOS	„inducible nitric oxide synthase“ (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase)
kDa	Kilodalton
K	Knochen
KG	Körpergewicht
Kn	Knorpel
l	Liter
Lig.	Ligamentum
µA	Mikroamper
µ-CT	Mikrocomputertomographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Mol
MAP	„mean arterial pressure“ (mittlerer arterieller Druck)
Mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NFκB	„nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“
n.s.	nicht signifikant
NO	„nitric oxide“ (Stickstoffmonoxid)
NOS	„nitric oxide synthetase“ (Stickstoffoxidsynthetase)
Ø	Durchmesser
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PCNA	„proliferating cell nuclear antigen“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM-1	„platelet endothelial/cell adhesion molecule“ (CD-31)
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
Pkt	Punkte
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidifluorid
RAS	Renin- Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	„Region of interest“
SDS	„sodium dodecylsulfate“
SEM	„standard error of the mean“ (Standardfehler)
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris gepuffertes salziges Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
V	Volt
V.	Vena
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

4. EINLEITUNG

Eine Fraktur ist der Definition nach eine vollständige oder unvollständige Kontinuitätsunterbrechung der Knochenstruktur und wird durch eine direkte oder indirekte Gewalteinwirkung hervorgerufen, die die Elastizität und Festigkeit des Knochens überschreitet. Begleitend treten Schmerz, Schwellung und Funktionsverlust der Extremität ein. Knochenbrüche können durch direktes adäquates Trauma, pathologische Veränderungen wie z.B. Osteoporose und Knochenmetastasen oder durch Dauerbeanspruchung mit rezidivierenden Mikrotraumen entstehen. Ziel der Frakturheilung ist es durch eine Zusammenführung der Frakturrenden die Wiederherstellung der mechanischen Funktion des Knochens zu erreichen. Die weltweite Inzidenz von Frakturen liegt zwischen 9,0 und 22,8 pro 1000 Einwohner im Jahr (Court-Brown and Caesar, 2006). Davon werden die meisten Frakturen konservativ behandelt, allerdings benötigen komplizierte Frakturen eine Reposition und operative Retention der Bruchstücke mit Hilfe von Drähten, Nägeln, Schrauben und Platten, um eine achsengerechte Stellung zu erhalten. Voraussetzung einer ungestörten Frakturheilung sind ein enger Kontakt der Frakturrenden, die ununterbrochene Ruhigstellung der Frakturrenden und eine ausreichende Durchblutung der Fragmente und des umgebenden Weichteilgewebes.

Trotz der ständigen Verbesserung der Therapie treten bei ca. 10% der Patienten Komplikationen auf. Durch die Fraktur selbst oder durch deren Versorgung entstehen Begleitverletzungen wie beispielsweise Weichteilschaden, Gefäß- und Nervenläsionen, welche den Verlauf der Frakturheilung negativ beeinflussen können. Darüber hinaus kann es zu einem ungünstigeren Verlauf in der Heilung durch das Auftreten eines Kompartmentsyndroms oder einer Infektion kommen. Bei Risikopatienten treten in bis zu 21% der Fälle eine verzögerte Heilung und bei 2-8% der Patienten eine Pseudarthrosenbildung auf (Court-Brown, 1998).

Frakturheilung erfolgt durch das Zusammenspiel einer komplexen Kaskade zellulärer Prozesse, beeinflusst und kontrolliert durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie ‚bone morphogenetic proteins‘, ‚transforming growth factor- β ‘, ‚insuline-like growth factor‘, ‚platelet-derived growth factor‘ und andere Zytokine.

4.1. Fraktur und Frakturheilung

4.1.1. Primäre Frakturheilung

Die primäre oder direkte Frakturheilung beschreibt eine Frakturheilung ohne die Bildung eines Frakturkallus. Voraussetzungen für eine direkte Verbindung der Kortices der beiden Fraktarenden sind mechanische Stabilität, ausreichende Vaskularisation und eine anatomische Reposition mit einem Abstand der Fraktarenden von weniger als 0,5mm. In der klassischen histologischen Terminologie werden die Kontaktheilung und die Spaltheilung unterschieden. (Willenegger et al., 1971; Schenk and Willenegger, 1977)

Schenk und Willenegger beobachten bei der Kontaktheilung, dass die Fraktarenden nicht absorbiert, sondern von neuen Haverschen Systemen rekanalisiert werden (Schenk and Willenegger, 1977). An Stellen, an denen die Bruchfragmente direkten Kontakt zu den Haverschen Kanälen der Gegenseite besitzen, sind sogenannte ‚cutting cones‘ in der Lage den Frakturspalt zu durchwandern und neue Haversche Systeme zu bilden. An der Spitze dieser ‚cutting cones‘ befinden sich Osteoklasten, welche noch vorhandene Knochensubstanz abbauen, woraufhin nachfolgende Osteoblasten neuen Knochen produzieren. Diese sogenannten ‚multicellular forming units‘, Einheiten aus Osteoklasten und Osteoblasten kanalisieren die Fragmente und schaffen auf diese Weise die Voraussetzung für neue Gefäßeinsprossungen. Die neuen Gefäße werden von Endothelzellen und Vorläuferzellen von Osteoblasten begleitet (Einhorn, 1998). Hierdurch wird ein überwiegend axial orientierter Lamellenknochen gebildet (Lungershausen and Schulz, 2000).

Findet sich ein schmaler Spalt zwischen den, durch eine stabile Osteosynthese versorgten, Fragmenten, so wird dieser Spalt zunächst mit Geflechtknochen ausgefüllt. Geflechtknochen, bestehend aus unregelmäßig angeordneten Kollagenfasern und Osteozyten, wird später in Lamellenknochen umgewandelt. Aufgrund des langsamen Verlaufs dieses Prozesses kommt es vor, dass die Revaskularisierung nicht durch die Gefäße der Haverschen Systeme, sondern durch intramedulläre oder periostale Gefäße, erfolgt. Die Orientierung der zunächst gebildeten Knochenstruktur verläuft überwiegend parallel zum Frakturspalt. Die

Osteone, die in Schafrichtung verlaufen, entstehen erst erheblich später (McKibbin, 1978).

4.1.2. Sekundäre Frakturheilung

Kennzeichen der sekundären oder indirekten Frakturheilung ist die Bildung eines intermediären Kallusgewebes im Frakturspalt. Auch die Versorgung der Fraktur durch Ruhigstellung im Gips, Fixateur externe oder intramedulläre Marknagelung erlaubt einen gewissen Grad an Bewegung im Frakturspalt. Eine Beweglichkeit zwischen den beiden Fraktarenden induziert die Kallusbildung (Claes et al., 1998).

Einhorn teilt den Prozess der Regeneration des Knochengewebes in fünf fließend ineinander übergehende Stadien ein (Einhorn, 1998):

- Hämatom und Entzündungsreaktion
- Angiogenese und Knorpelbildung
- Knorpelkalzifizierung
- Knochenbildung
- Remodelling

Durch die Beschädigung von Blutgefäßen in Knochen, Knochenmark und umgebendem Weichteilgewebe entsteht unmittelbar nach der Fraktur ein Hämatom, bestehend aus Erythrozyten und Thrombozyten. Bereits nach kurzer Zeit infiltrieren Granulozyten, Monozyten und Mastzellen das Wundgebiet, rufen eine Entzündungsreaktion hervor und beginnen mit dem Abbau des Gewebes. Von den Zellen im Frakturgebiet werden verschiedene Signalmoleküle und Zytokine gebildet, welche Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Migration von mesenchymalen Stammzellen fördern sowie die Kapillaraussprossung begünstigen. Das Hämatom wird durch Einwanderung von Fibroblasten und durch Bildung von Granulationsgewebe zum bindegewebigen Kallus organisiert.

Vom Periosteum induziert bildet sich frakturspaltfern, intramembranös Geflechtknochen gegenüber dem Kortex. Etwa in der zweiten Woche der

Frakturheilung bedeckt reichlich hyaliner Knorpel die Fraktarenden, produziert durch eingewanderte Chondroblasten. Nachfolgend kalzifizieren die Knorpelzellen und neue Gefäße wachsen in das Gewebe ein. Mit ihnen kommen Chondroklasten, Osteoblasten und Osteoklasten in das Knorpelgerüst und wandeln es in Geflechtknochen um. Ist die Fraktur ausreichend überbrückt, passt sich der Knochen wieder seiner ursprünglichen Funktion an. Durch Remodelling entsteht mechanisch stabiler lamellärer Knochen (McKibbin, 1978; Frost, 1989; Braun and Ruter, 1996).

Während makroskopisch die Frakturheilung in primär und sekundär unterschieden wird, gliedert die Histologie die Knochenneubildung in desmal und enchondral. Bei der desmalen Frakturheilung wird das Knochengewebe direkt aus Mesenchymzellen, die sich über Osteoblastenvorläuferzellen in Osteoblasten umwandeln, gebildet. Osteoblasten produzieren das Osteoid, bestehend aus kollagenen Fasern und Grundsubstanz. Durch die anschließende Kalzifizierung entsteht Geflechtknochen.

Die enchondrale Knochenneubildung beginnt mit der Errichtung eines Knorpelgerüsts an den Fraktarenden. Die Knorpelzellen hypertrophieren und Teile der Chondrozytenmembran setzen Kalzium aus ihren Mitochondrien in die extrazelluläre Matrix frei. Proteasen und Phosphatasen helfen bei der Kalzifizierung des Knorpels. Mit einwachsenden Blutgefäßen eingeschwemmte Osteoklasten und Osteoblastenprogenitorzellen bilden dann erst in einem zweiten Schritt neuen Knochen anstelle des abgebauten Knorpels (Hulth, 1989; Einhorn, 2005).

4.1.3. Zeitliche und regionale Abfolge der sekundären Frakturheilung

Kortikalis, Periosteum, Weichteilgewebe und das Knochenmark sind die Strukturen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Frakturspalt, welche Einfluss auf Prozesse der Frakturheilung nehmen. Die Zone um den Frakturspalt selbst kann in vier Regionen eingeteilt werden (Abb. 1):

- äußere Bindegewebsregion
- knöcherner periostaler Kallus
- Kortikalis
- kortikaler Frakturspalt

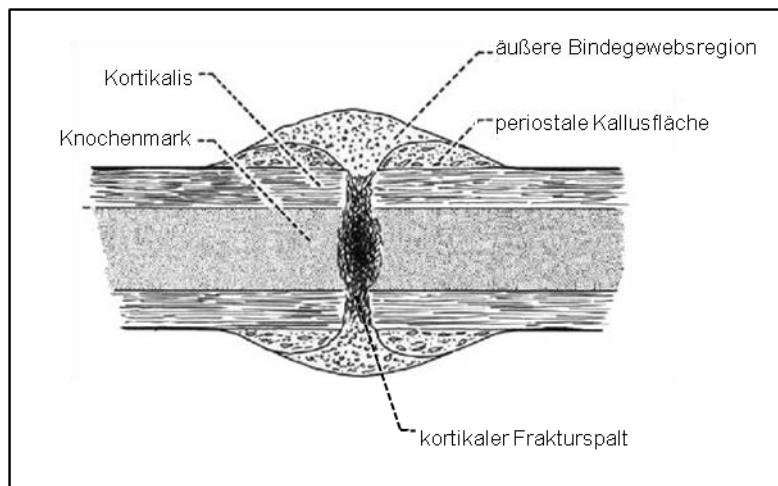


Abb. 1: Zonen der Frakturheilung
(nach Einhorn, 2005)

Brighton und Hunt entdeckten bereits zwölf Stunden nach der Fraktur eine Umorganisation der Knochenmarkszellen und das Verschwinden von Blutgefäßen im Hämatom des Frakturspalts bei Kaninchen (Brighton and Hunt, 1991). Am dritten Tag beginnt die Bildung eines periostalen Kallus mittels desmaler Ossifikation. Dieser periostale Kallus besteht aus Geflechtknochen und ist zwischen Diaphyse und Periost anzutreffen. Knorpelzellen überbrücken und stabilisieren den bindegewebigen Kallus. Um den neunten und elften Tag nach der Fraktur sprießen Blutgefäße aus dem periostalen Bindegewebe in den Knorpelkallus ein und leiten die enchondrale Ossifikation ein (Hulth, 1989). Die Wiederherstellung einer kortikalen Knochenstruktur erfolgt erst nach Monaten. Zuvor sind die Fraktarenden bereits durch Geflechtknochen verbunden (McKibbin, 1978).

4.1.4. Einflüsse von Angiogenese, Weichteilschaden und Inflammation

Eine verminderte Angiogenese, ein Weichteilschaden und eine verstärkte Entzündungsreaktion können eine verzögerte und gestörte Fraktur- und Wundheilung zur Folge haben (Lungershausen and Schulz, 2000; Hausman et al., 2001).

Die Angiogenese ist für die Knochenheilung von entscheidender Bedeutung, da sie nicht nur zur Sauerstoffversorgung der im Frakturgebiet vorhandenen Zellen beiträgt, sondern auch für die Rekrutierung osteogener Zellen wichtig ist (Kanczler and Oreffo, 2008). Während die Flussrichtung der Blutversorgung in den langen Röhrenknochen

physiologischerweise zentrifugal von den Markräumen zur Kortikalis abläuft, erfolgt die Versorgung während des Heilungsprozesses überwiegend aus den periostalen Gefäßen (Braun and Ruter, 1996).

Gewebeschädigung und Blutung sind die Folgen nahezu aller Verletzungen (Oestern and Tscherne, 1983). Klinisch wird das Outcome der Patienten nach komplexen Frakturen durch das Ausmaß der Weichteilschädigung wesentlich mitbeeinflusst. Zum einen gehen Weichteiltraumata mit einer verlangsamten Knochenbildung in der frühen Phase der Frakturheilung einher (Claes et al., 2006), und zum anderen verschlechtert ein Verlust des umgebenden Muskelgewebes signifikant die Knochenbruchheilung (Utvag et al., 2002; Utvag et al., 2003).

Während der Frakturheilung ist eine gewisse inflammatorische Reaktion für den physiologischen Ablauf der Frakturheilung notwendig, allerdings hat eine überschießende Entzündungsreaktion im Rahmen einer Infektion für die Frakturheilung fatale Folgen im Sinne einer gestörten und verzögerten Frakturheilung. Die Infektionsrate liegt im deutschsprachigen Raum bei 2-3%, bei offenen Frakturen in seltenen Fällen bis zu 10% (Hansis et al., 1997). Die Zeichen einer Infektion sind neben Schmerz auch die klassischen lokalen Entzündungsmerkmale wie Rötung, Schwellung, Überwärmung und eine eingeschränkte Funktion. Die gestörte Frakturheilung lässt sich röntgenologisch am breiter werdenden Spalt, an der ausschließlich fernab des Frakturspaltes ablaufenden periostalen Reaktion, am „wolkigen“ Kallus, an zystischen Auflockerungen im Frakturbereich und dem fehlenden Knochenkontakt der Frakturrenden erkennen (Lungershausen and Schulz, 2000).

4.2. Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) war klassischerweise bekannt als eine zirkulierende systemische Kaskade von Hormonen und Enzymen zur Regulierung des Blutdrucks und des Elektrolythaushaltes. Im Gegensatz zum systemischen RAS wurde in verschiedenen Organen in den letzten Jahren ein lokales RAS gefunden, welches unabhängig vom systemischen RAS Gewebefunktionen reguliert.

4.2.1. Systemisches RAS

Das systemisch wirksame RAS ist das bedeutendste blutvolumen- und blutdruckregulierende endokrine System. Renin, eine Aspartylprotease, wird in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet. Stimuli für die Reninausschüttung können ein erniedrigter Perfusionsdruck der Nierengefäße, ein erniedrigtes NaCl-Angebot an der Mucula densa oder eine β_1 -adrenerge Rezeptoraktivierung sein. Renin spaltet das, in der Leber und im Fettgewebe produzierte α_2 -Glykoprotein, Angiotensinogen in Angiotensin I (ANG I). Aus dem Dekapeptid ANG I entsteht dann durch das ‚Angiotensin-Converting‘-Enzym (ACE, Abb. 2) das vasoaktive Angiotensin II (ANG II) durch die weitere Abspaltung der zwei Aminosäuren Histidin und Leucin.

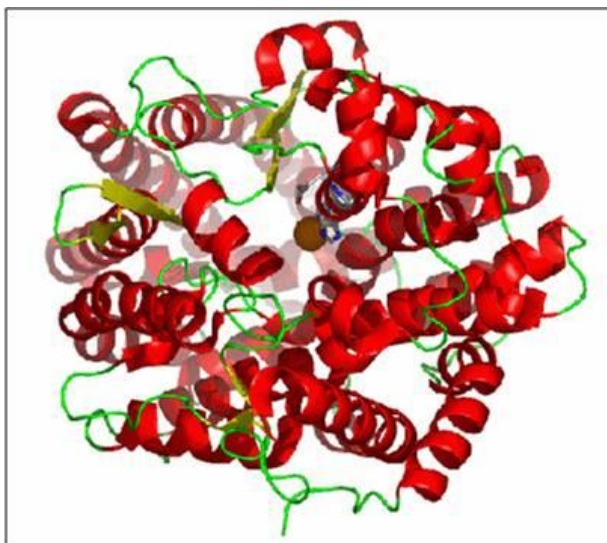


Abb. 2: 3D-Struktur des ACEs, welches die Umwandlung von ANG I in ANG II durch Abspaltung eines Dipeptids katalysiert (Department of Chemistry, University of Maine, USA).

Der größte Anteil des ANG II wird an der Oberfläche der Endothelzellen der Lunge produziert, welche reichlich ACE exprimieren. Die physiologisch aktive Komponente dieses Systems ist überwiegend das Peptidhormon ANG II (Peach, 1977).

Die Hauptwirkungen von ANG II werden über zwei G-Protein-gesteuerte Rezeptorsubtypen AT₁-R und AT₂-R vermittelt, welche sich in 30% ihrer Sequenz ähneln. Durch verschiedene Mechanismen in der Signalkaskade unterscheiden sich die beiden Rezeptoren allerdings grundlegend. Während AT₁-R durch die Phospholipasen A, C, D, Inositoltriphosphat, Kalziumkanäle und verschiedene Serin-, Threonin- und Tyrosinkinasen seine Wirkung vermittelt, beinhaltet der Signaltransduktionsweg von AT₂-R hingegen Serin- und Tyrosinphosphatasen, Phospholipase A₂, Nitrit-Oxid und zyklisches Guanosinmonophosphat (Peach, 1977).

Der AT₁-R ist an den meisten physiologischen Funktionen des RAS beteiligt, wobei er hauptsächlich die Regulation des Gefäßtonus und die Natriumreabsorption kontrolliert. Der AT₂-R ist im erwachsenen Gewebe in nur geringer Dichte vorhanden, allerdings wird er in der fetalen Entwicklung verstärkt exprimiert und ist in der Pathogenese und im Remodelling bei z.B. Herz- und Nierenkrankheiten hochreguliert (de Gasparo et al., 2000). Die Funktionen des AT₂-R sind noch Teil intensiver Forschung. Es wird vermutet, dass er vor allem Auswirkungen des AT₁-R in Bezug auf die Blutdruckregulation und Proliferation entgegensteuert (Carey et al., 2000).

4.2.2. Lokales RAS

Die Expression vieler Komponenten des RAS in unterschiedlichen Organen und Geweben führte zu der Hypothese eines vom systemischen unabhängigen, lokalen RAS. Im Gehirn sind beispielsweise ANG II, Renin und ACE bereits 1973 nachgewiesen worden (Finkelman, 1973). Die Undurchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für ANG II kann als beweisend für das Vorhandensein eines lokalen RAS im ZNS angesehen werden. Außer im Gehirn können alle Bestandteile des RAS unter anderem im Herz (Bader et al., 2001), in den Gonaden (Speth et al., 1999), im Pankreas (Sernia, 2001), in der Plazenta (Nielsen et al., 2000), und in der Niere (Navar et al., 1997) nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung für die

Frakturheilung erscheinen ein lokales RAS im Gefäßsystem (Bader et al., 2001), Skelettmuskel (Reneland and Lithell, 1994), Fettgewebe (Engeli et al., 2000) und Knochenmark (Haznedaroglu and Ozturk, 2003).

Solch ein lokales RAS kann gänzlich oder nur partiell unabhängig vom systemischen funktionieren. Seine Wirkung entfaltet es vor allem auf zellulärer Ebene, denn durch parakrine, autokrine und intrakrine Effekte vermittelt es spezifische Wirkungen für Zellwachstum, Proliferation, Zellmetabolismus und Apoptose (Fyhrquist and Saijonmaa, 2008).

Auch Inflammation, die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, Hormonsekretion und Gefäßtonus werden lokal beeinflusst. Darüber hinaus kann das RAS auch direkt intrazellulär im Zellkern auf der Ebene der DNA angreifen und auf die Transkription von Proteinen einwirken (Leung, 2004). Einige Reaktionen der Rezeptoraktivierung der ANG II-Rezeptoren sind in Abb. 3 dargestellt.

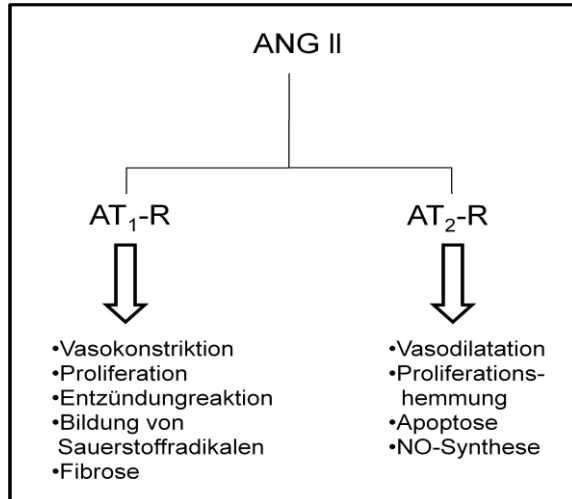


Abb. 3: Schematische Darstellung der Rezeptorfunktionen des lokalen RAS (nach Leung, 2004).

4.2.3. *Bradykinin*

Das Renin-Angiotensin-System steht über das ACE mit dem Kallikrein-Kinin-System in enger Verbindung. ACE katalysiert nicht nur die Umwandlung von ANG I in ANG II, sondern baut darüber hinaus auch Bradykinin in inaktive Peptide ab. Des Weiteren haben Angiotensin-Derivate wie das ANG-(1-7) ähnliche Wirkungen wie Kinine (Tschope et al., 2002). Bradykinin selbst entsteht aus Kininogen mit Hilfe der Protease Kallikrein in Mastzellen und basophilen Granulozyten im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion. Bradykinin wirkt über die Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren B₁-R und B₂-R als Vasodilatator, erhöht die Gefäßpermeabilität und sensibilisiert Nozizeptoren. Die Bradykinin-Rezeptoren werden in osteogenen Zellen exprimiert (Brecht et al., 2008), sodass auch im Knochen eine Wirkung angenommen werden kann. Von pathologischen Prozessen am Knochen ist eine Beeinflussung durch das Kallikrein-Kinin-System bekannt. So können proinflammatorische Mediatoren, wie sie im Kallikrein- Kinin-System gebildet werden, beispielsweise eine entzündliche Knochenresorption begünstigen (Brecht et al., 2008). Bei der rheumatoiden Arthritis führt Bradykinin dazu, dass die osteoklastenvermittelte Knochenresorption und damit der Abbau der Mineralien im Knochen und der Knochenmatrix erhöht wird (Lerner et al., 1987). Über die genaue Wirkung von Bradykinin auf die Knochenneubildung, -resorption und Remodellingvorgänge, die während der Frakturheilung ablaufen, existieren noch keine Studien.

4.2.4. *ACE-Blockade*

Seinen Ursprung hat die Blockade des ACE in den 1960ern als bekannt wurde, dass Peptide des Giftes der Jararaca-Lanzenotter (*Bothrops jararaca*) die Kinase II, welche identisch mit ACE ist, hemmen. Hierdurch konnte eine blutdrucksenkende Wirkung bei Patienten mit arterieller Hypertonie und positive hämodynamische Effekte bei Patientin mit Herzinsuffizienz erzielt werden (Ferrario, 2006). Im Vergleich zu Captopril, dem ersten oralen ACE-Inhibitor, wurden bei den neuen ACE-Inhibitoren wie Perindopril (Abb. 4) die Sufhydryl-Gruppe durch eine Carboxyl-Gruppe ersetzt, was den ACE-Inhibitor nebenwirkungsärmer und gewebebegängiger

machte (Brown and Hall, 2005). Die allgemeinen pharmakologischen Wirkungen von ACE-Inhibitoren beinhalten als Folge des Abfalls der ANG II-Konzentration eine Reduktion der Vor- und Nachlast des Herzens mit nachfolgender Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks. Der ACE-Inhibitor erreicht im Vergleich zu direkten Vasodilatoren eine Verminderung des peripheren Widerstands ohne eine reaktive Herzfrequenzerhöhung (Lopez-Sendon et al., 2004). Außerdem führt die Behandlung mit einem ACE-Inhibitor zur Senkung des renalen Gefäßwiderstandes, verbesserter renaler Durchblutung mit erhöhter Salz- und Wasserausscheidung und schützt vor Progression einer Mikroalbuminurie und eines Nierenversagens (Lewis et al., 1993; Maschio et al., 1996). Nach einem Herzinfarkt verzögern ACE-Inhibitoren nachweislich das Remodelling und schützen vor der Progression einer chronischen Herzinsuffizienz (Pfeffer et al., 1992; Yusuf et al., 2000). ACE-Inhibitoren gehören zu den am häufigsten verordneten Antihypertensiva in Deutschland. Im Jahr 2009 machten ACE-Hemmer und Angiotensinrezeptorantagonisten zusammen 51% des Verordnungsvolumens der Antihypertensiva aus, wovon ca. drei Viertel auf die ACE-Hemmer entfielen (Schwabe and Paffrath, 2010).

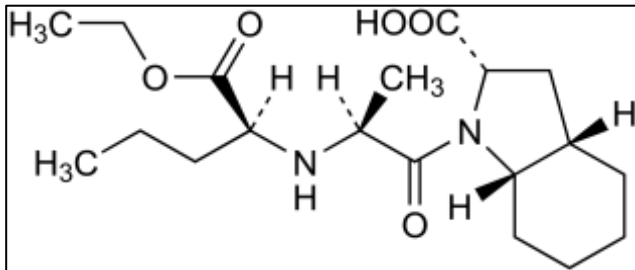


Abb. 4: Strukturformel von Perindopril
(nach www.ParmaWiki.com)

4.3. RAS und Frakturheilung

Verschiedene Bestandteile des RAS wurden bereits in-vitro in Osteoklasten und Osteoblasten nachgewiesen und diverse in-vitro Studien berichteten über einen möglichen Einfluss des RAS auf osteogene Zellen (Hatton et al., 1997; Hiruma et al., 1997; Hagiwara et al., 1998; Lamparter et al., 1998). In experimentellen Versuchen wurde gezeigt, dass ANG II als Haupteffektormolekül des RAS den Kalziumstoffwechsel beeinflussen kann (Schurman et al., 2004). Eine Wirkung von ANG II setzt ein Vorhandensein von Angiotensinrezeptoren auf, am Knochenstoffwechsel beteiligten, Zellen voraus. Angiotensinrezeptoren werden in osteoblastischen Zelllinien in menschlichem und fetalem Knochen exprimiert (Bowler et al., 1998). Hiruma et al. demonstrierten in-vitro eine stimulierende Wirkung von ANG II auf die Proliferation osteoblastenreicher Zellpopulationen (Hiruma et al., 1997). Dagegen berichteten Hatton et al., dass in Anwesenheit von Osteoblasten ANG II die Knochenresorption stimuliert (Hatton et al., 1997). In-vitro- und in-vivo-Versuche zeigen eine reduzierte Kalziumaufnahme in den Knochen bei der Behandlung von Knochenscheiben aus neugeborenen Ratten mit ANG II (Schurman et al., 2004). Neben in-vitro- und in-vivo-Versuchen haben klinische Studien gezeigt, dass Patienten, die mit einem ACE-Inhibitor therapiert wurden, eine höhere Knochendichte aufwiesen (Lynn et al., 2006). Darüber hinaus veröffentlichten Rejnmark et al., dass die Behandlung mit einem ACE-Inhibitor das Frakturrisiko beim Menschen um 7% reduziert (Rejnmark et al., 2006).

Die aufgeführten Studien weisen darauf hin, dass verschiedene Ansatzpunkte und Möglichkeiten existieren, wie ANG II, ACE oder ein ACE-Inhibitor auf Knochenzellen und ihren Metabolismus wirken können. Ob Komponenten des RAS während der Frakturheilung im Kallus exprimiert werden, und wie ein potenzielles lokales RAS im Knochen die Frakturheilung beeinflusst, ist bisher nicht bekannt.

4.4. Ziele der Arbeit

- Wird ACE im normalen, unfrakturierten Knochen exprimiert?
- Wie beeinflusst die Blockade des RAS die Knochendichte im normalen, unfrakturierten Knochen?
- Werden Bestandteile des RAS während der Frakturheilung exprimiert?
- Wie wirkt sich die Blockade des RAS durch Hemmung des Schlüsselenzyms ACE auf die Frakturheilung aus?
- Wie beeinflusst die Blockade des RAS durch Hemmung des Schlüsselenzyms ACE die Knochendichte im Frakturkallus?
- Was sind mögliche Mechanismen für die Wirkung der Hemmung des Schlüsselenzyms ACE auf die Frakturheilung?

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. Tiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch die Saar-Pfalz-Kreis-Kreispolizeibehörde an CD-1-Mäusen durchgeführt (Kennzeichen: K110/180-07). Die Tiere mit einem Gewicht von $34 \pm 0,3$ g wurden unter klimatisierten Bedingungen bei einer Temperatur von 22-24°C, einer Luftfeuchtigkeit von etwa 60% und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardlaborfutter.

5.2. Vorversuche

5.2.1. Ermittlung der Trinkmenge der Versuchstiere

Um die Trinkmenge der Versuchstiere zu ermitteln, wurden sechs operierten Mäusen Trinkwasser ad libitum sechs Tage lang angeboten und das verbrauchte Volumen abgemessen. Die durchschnittliche Trinkmenge pro Tag lag bei 7,5ml.

5.2.2. Perindopril-Lösung

Konzentrationsberechnung

Der ACE-Hemmer Coversum[®] 4mg (Servier Deutschland GmbH, München) mit dem Wirkstoff Perindopril-Erbumin konnte in Tablettenform aus der Klinikapotheke bezogen werden. Eine Tablette enthält laut Hersteller 3,338mg Perindopril. Zieldosis des Medikaments war 3mg/kg Körpergewicht der Maus.

Herstellung und Handhabung der Trinklösung

Für die Lösung wurde eine Tablette Perindopril zermörsert, in Trinkwasser aufgelöst (3,338mg/277ml entspricht 0,012mg/ml), ca. eine Stunde mit dem Magnetrührer auf 150U/min gerührt und danach im Kühlschrank bei +4°C gelagert. Vor dem Einfüllen in die Trinkflaschen für die Mäusekäfige erwärmte man die Lösung auf dem Magnetrührer wieder auf Zimmertemperatur. Der Austausch der Lösung und der Wechsel der Trinkflaschen erfolgte alle drei Tage.

5.2.3. Trinkversuch mit der Perindopril-Lösung

Zwei operierten Mäusen wurde sieben Tage lang anstatt Leitungswasser die hergestellte Perindopril-Lösung in ihren Trinkwasserflaschen angeboten. Sie tranken durchschnittlich 8,2ml pro Tag. Die tägliche Perindopril-Aufnahme betrug demnach ~0,01mg/Tag. Bei einem mittleren Gewicht der untersuchten Mäuse von 34g entspricht dies einer Tagesdosis von 2,9mg/kg KG.

5.3. Studiendesign

Die Studie bestand aus zwei Versuchsgruppen (Abb. 5). Davon erhielt die erste Hälfte der Tiere Perindopril-Lösung und die zweite Hälfte der Tiere normales Leitungswasser zum Trinken. Zur Beurteilung der Frakturheilung und der Knochendichte wurden fünf verschiedene Auswertverfahren eingesetzt. Zu definierten Untersuchungszeitpunkten (2, 5 und 10 Wochen) erfolgte die radiologische, biomechanische und histologische Auswertung. Die Western-Blot-Analyse wurde nach 2 Wochen und das μ -CT zur Knochendichtebestimmung im Kallus und im unfrakturierten Knochen nach 10 Wochen durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung des Parathormonspiegels im Serum bei Tieren aus allen Gruppen Blut entnommen.

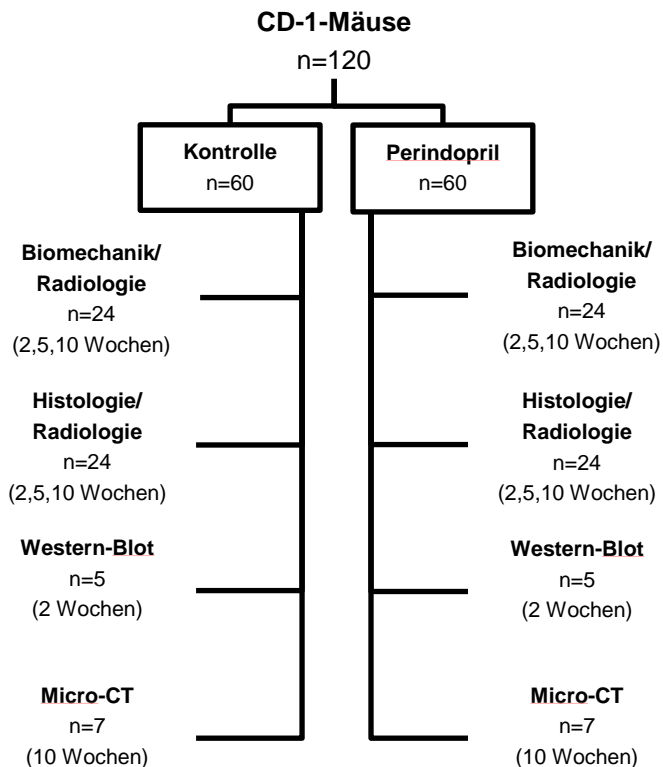


Abb. 5: Darstellung des Studiendesigns mit Versuchsgruppenzuordnung, Auswertungsverfahren, Angabe der Anzahl der Versuchstiere (n) zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten.

5.4. Operation

5.4.1. Anästhesie und Operationsvorbereitung

Das Leitungswasser in den Trinkflaschen der Mäuse der Perindopril-Gruppen wurde 24 Stunden vor der Operation gegen Perindopril-Lösung ausgetauscht. Von allen Mäusen ermittelte man präoperativ das Gewicht zur korrekten Narkosedosierung.

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketamin (Ketavet, 75 mg/kg KG, Pfizer, Karlsruhe) und Xylazin (Rompun, 25 mg/kg KG, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) anästhesiert. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, bestrich man die Kornea mit Dexpanthenol-Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Nach Rasur (Electra II, Aesculap AG, Tuttlingen) des rechten Beines bis über die Hüfte hinaus und Epilieren mit Enthaarungscreme (elca med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg, 15 Minuten Einwirkzeit) wurde die Enthaarungscreme

abgewaschen und anschließend das Bein mit Softasept-Spray (Braun AG, Melsungen) desinfiziert.

5.4.2. Frakturmodell

Als Frakturmodell (Abb. 6) diente eine offene Osteotomie des rechten Mäusefemurs. Aus einer 24G Kanüle (BD Microlance, Irland, $\varnothing=0,55\text{mm}$) entstand durch Kürzen und Abflachen ein Verriegelungsnagel (Pin), der zur Stabilisation in den Markraum eingebracht wurde (Holstein et al., 2007). Eine ca. 4mm lange Klammer (Clip), hergestellt aus einer 27G Kanüle (BD Microlance, Irland, $\varnothing=0,4\text{mm}$), sicherte die Defektbreite von 0,25mm (Garcia et al., 2008a). Das Femur wurde mit Hilfe einer Gigli-Säge (AO Development Institute Davos, Schweiz, $\varnothing=0,22\text{mm}$) im mittleren Drittel der Diaphyse osteotomiert. Das linke Bein blieb zur Kontrolle ohne Operation und Osteotomie.

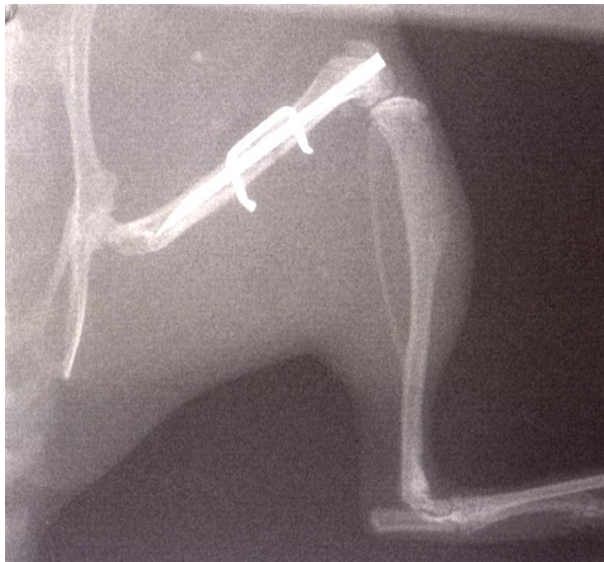


Abb. 6: Röntgenbild eines osteotomierten, rechten Mäusefemurs mit Pin-Clip-Fixation.

5.4.3. OP-Technik

Einbringen des Pins

Das Versuchstier wurde auf dem Rücken gelagert. Unter möglichst sterilen Bedingungen setzte die Operateurin einen ca. 4mm langen Schnitt medial der Patella, schob das Lig. patellae unter Flexion im Kniegelenk nach lateral und brachte dadurch die beiden Kondylen des Femurs zum Vorschein. Nach dem Bohren eines Loches mit einem Durchmesser von 0,5mm (Proxxon NG 2/S, Nielsbach) durch die Fossa intercondylaris wurde eine distal abgeflachte 24G Nadel als Pin in den Markraum implantiert (Abb. 7A) und am Austritt zwischen den Kondylen so kurz wie möglich abgetrennt. Die Patellarsehne konnte danach reponiert und mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Seide 6-0, F.Ernst GmbH & Co. KG, Hannover) mit ein bis zwei Einzelknopfnähten am Muskel fixiert werden, um später eine spontane Luxation der Patella zu verhindern. Die anschließende Hautnaht und Desinfektion schloss den ersten Teil der Operation ab.

Einbringen des Clips

Die Benutzung eines Operationsmikroskops (Leica M651 ICA, 16x bzw. 32x Vergrößerung) erleichterte die folgenden operativen Schritte. In Bauchlagerung des Versuchstiers wurde zunächst ein lateraler Zugang zum Femur durch eine 10mm lange Hautinzision und behutsame intermuskuläre Freilegung des Femurs geschaffen, wobei große Aufmerksamkeit auf den Erhalt des Periosteums gelegt wurde, dessen Vaskularisierung im Operationsmikroskop gut erkennbar war (Abb. 7B). Der Clip benötigte zwei Bohrlöcher, wovon das erste im distalen Drittel und das zweite nach Ausmessen durch den Clip proximal gebohrt wurde (Abb. 7C). Nach dem Einsetzen des Clips bog man seine beiden dorsalen Enden mit einem handelsüblichen Seitenschneider leicht um, um ein Herausrutschen des Clips zu verhindern. Mit Hilfe einer Gigli-Draht-Säge entstand ein 0,25mm breiter Femurdefekt (Abb. 7D,E).

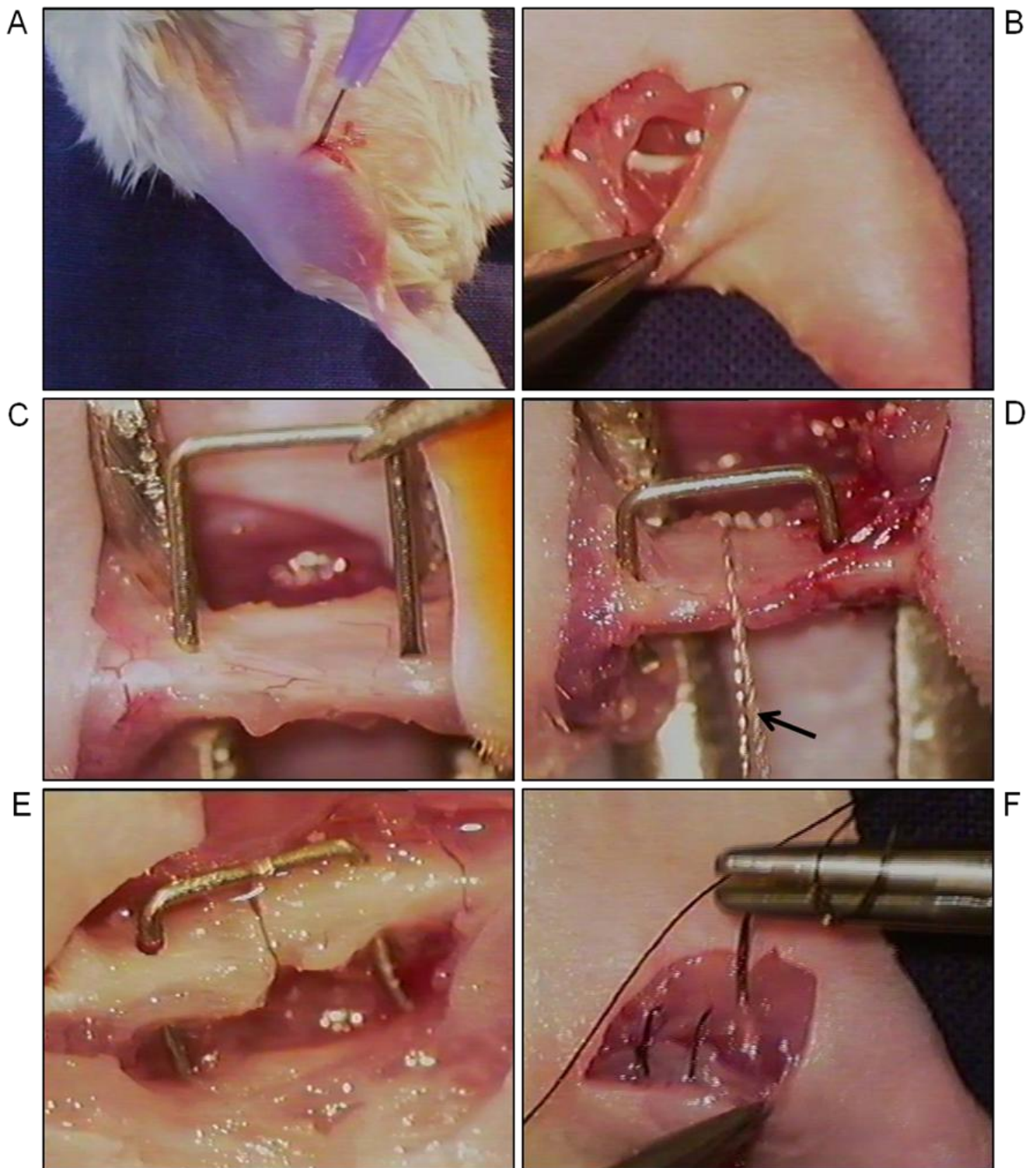


Abb. 7: Operativer Ablauf des Pin-Clip-Verfahrens: Durch einen ventralen Zugang am Knie wurde der Pin eingebracht (A). Schaffen eines zweiten Zugangs lateral am Femur (B), um den Clip für die Achs- und Rotationsstabilität anzubringen (C). Durch eine Osteotomie des Femurs mittels Gigli-Draht-Säge (Pfeil) (D) entsteht ein 0,25mm breiter Osteotomiespalt mit Pin-Clip-Fixation (E). Schichtweiser Wundverschluss (F).

Während der gesamten Operation wurde das Operationsgebiet mehrmals mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B.Braun Melsungen AG) zum Schutz vor Austrocknung und während des Sägens zur Kühlung gespült. Abschließend wurde das Operationsfeld mit stark verdünnter Braunol-Lösung (Povidon-Iod, B.Braun Melsungen AG) desinfiziert. Es folgte schrittweise der Wundverschluss als fortlaufende Muskel- und Hautnaht (Abb. 7F) und Wunddesinfektion mit Softasept-Spray.

Postoperative Versorgung

Bis zur Rückkehr der motorischen Aktivität standen die Mäusekäfige vor einer Rotlichtlampe, um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern. Die Mäuse erhielten postoperativ nach 24 und nach 48 Stunden eine subkutane Applikation des Analgetikums Caprofen (Rimadyl, 6,5 mg/kg, Pfizer GmbH, Karlsruhe). Unmittelbar nach der Operation wurden die Mäuse in Einzelkäfige verteilt. Wenn sich nach einigen Tagen ihr Bewegungs- und Fressverhalten normalisierte und die Wundheilung eingesetzt hatte, wurden bis zu fünf Tiere gleichen Geschlechts zusammen in einem Käfig bis zum Versuchsabschluss untergebracht.

5.5. Versuchsabschluss

Zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten (nach 2, 5 und 10 Wochen) wurden die Tiere wieder mit einer intraperitonealen Ketamin/Xylazin-Narkose anästhesiert. Um die korrekte Lage von Pin und Clip sicherzustellen, erstellte man eine Röntgenaufnahme des rechten Hinterbeines, welche auch für die radiologische Auswertung verwendet wurde. Im Anschluss wurde den Tieren mittels heparinisierter Kanüle und 1ml-Spritze Blut aus der V. cava entnommen. Nach der Tötung der Versuchstiere durch eine Überdosis des Narkotikums Ketamin/Xylazin erfolgte die Explantation der Femora je nach Gruppe rechts oder beidseits (Abb. 8).



Abb. 8: Reseziertes osteotomiertes rechtes Femur nach partieller Weichteilentfernung mit Pin und Clip in situ.

5.6. Auswertungsverfahren

4.6.1. Gewicht, Blutdruck und Herzfrequenz

Bei allen Versuchstieren wurde das Körpergewicht präoperativ und vor Versuchsabschluss ermittelt.

Die Implantation eines Polyethylenkatheters (Portex, Ø=0,28mm, Smith Medical International, Kent, England) in die A. carotis communis ermöglichte die Messung von mittlerem arteriellen Druck (mmHg) und Herzfrequenz ($1/\text{min}$) zu den Zeitpunkten 2, 5 und 10 Wochen (Servomed, Hellige GmbH, Freiburg).

5.6.2. Konventionelle Radiologie

Die seitlichen Röntgenaufnahmen der rechten Femora (Heliodent DS, 60mV, 0.08ms Belichtungszeit, 50/60Hz, Sirona Dental Systems, Bensheim) wurden im anterior-posterioren Strahlengang mit einem Abstand von 35mm zwischen Strahlenquelle und Röntgenfilm (Kodak IP-21 'high resolution dental films', Eastman Kodak Company, New York, USA) aufgenommen, welcher direkt im Anschluss in einem Automaten für intraorale Röntgenfilme (Periomat Plus, Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen) entwickelt wurde. Anschließend wurden die Röntgenaufnahmen auf einer Durchleuchtungsplatte mit einem Operationsmikroskop unter 4-facher Vergrößerung aufgenommen und für die weitere Analyse digitalisiert. Zur Beurteilung der Frakturheilung bestimmte man den Kallus- und Femurdurchmesser mit Hilfe einer

Computersoftware (Image J 1.37v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und errechnete daraus das Verhältnis aus Kallus- und Femurdurchmesser des frakturierten Beines (Abb. 9). Zusätzlich erfolgte eine Punktevergabe für den Heilungsgrad der Fraktur entsprechend der Klassifikation von Goldberg (Goldberg et al., 1985), bei der null Punkte für Pseudarthrose bzw. "nicht geheilt", ein Punkt für "potenziell geheilt" und zwei Punkte für "geheilt" vergeben wurden.

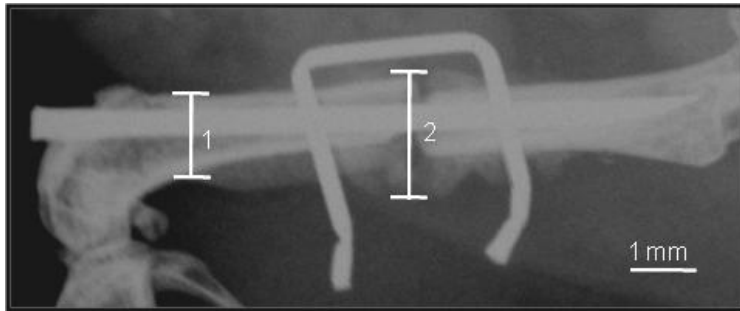


Abb. 9: Schematische Darstellung der radiologischen Auswertungsparameter Femurdurchmesser (1) und Kallusdurchmesser (2).

5.6.3. Biomechanik

Für die biomechanische Testung wurden beide Femora explantiert. Die Präparation beinhaltete die vorsichtige Ablösung des umgebenden Bindegewebes, Entfernung des Marknagels, mittiges Auseinanderzwicken der Klammer, Einwickeln des Knochens in feuchte Kompressen und Lagern bei minus 25°C bis zur biomechanischen Auswertung. Bei den nun folgenden Schritten wurde darauf geachtet, dass die Präparate immer feucht gehalten wurden. Die proximalen und distalen Enden der kurz vorher aufgetauten Femora bettete man in 10mm lange Metallzylinder ($\varnothing=8\text{mm}$) mit Knochenzement (Paladur, Hareus Kurzer GmbH, Hanau) ein, sodass zwischen den Zylindern ein 5mm langes, freies Femurstück verblieb. Das Einspannen der Knochen, in die in Abb. 10 dargestellte, computergesteuerte Torsions-Testvorrichtung (FMT-400, FMI-210B2, Alluris, Freiburg) mit kontinuierlicher Drehbewegung von $0,15^\circ/\text{s}$ ermöglichte die Messung von maximalem Drehmoment (Nmm) und entsprechendem Rotationswinkel ($^\circ$). Die Torsionssteifigkeit ($\text{Nmm}/^\circ$) ließ sich aus der linearen Steigung der Drehmoment-Rotationswinkel-Kurve ermitteln. Alle Werte des osteotomierten Femurs wurden in Prozent des korrespondierenden nicht-osteotomierten Femurs angegeben, um den

intraindividuellen Unterschieden der Knochensteifigkeit einzelner Tiere gerecht zu werden.

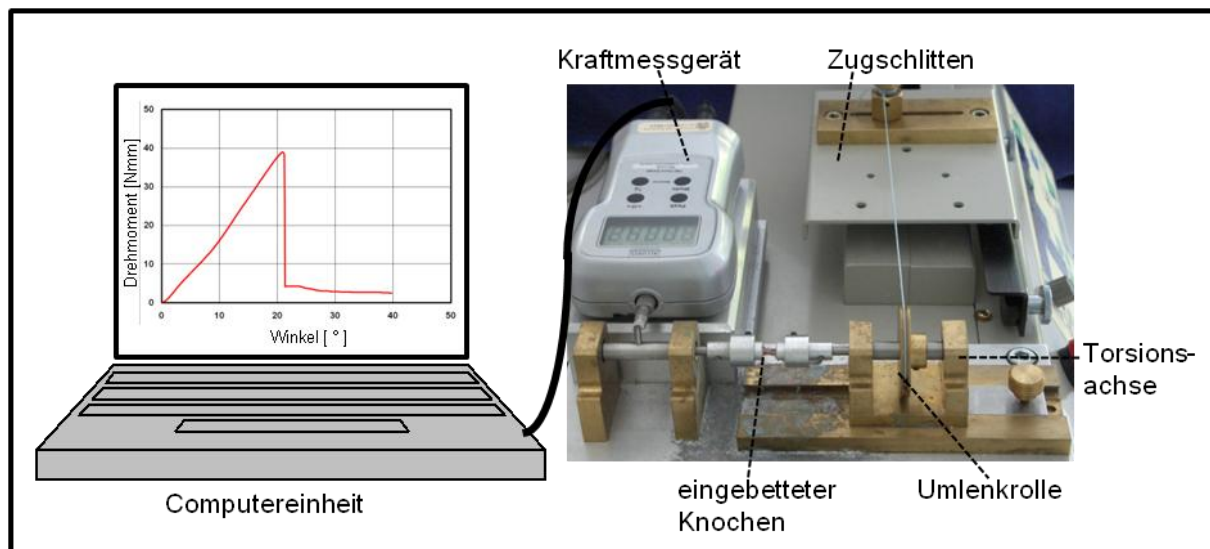


Abb. 10: Biomechanische Testapparatur.

5.6.4. Histologie und Immunhistochemie

Histomorphologie

Mit Hilfe der Histologie war es möglich die Frakturheilung morphologisch zu beurteilen. Dazu wurden die rechten Oberschenkelknochen reseziert, vom umgebenden Bindegewebe befreit und ohne Klammer in Zink-Fixativ (BD Pharmingen, San Diego, USA) für 24 h eingelegt. Nach der vierwöchigen Entkalkung im 10%igen EDTA-Bad konnte der Pin mühelos entfernt werden, wodurch die Kallusmorphologie intakt blieb. Von den, in Paraffinblöcke eingebetteten, Oberschenkelknochen konnten später 5µm dünne Längsschnitte hergestellt und nach der Masson-Goldner-Trichrom-Methode gefärbt werden.

Die Digitalisierung der Präparate für die histologische Auswertung erfolgte mit einem Fotomikroskop (Olympus BX60, Zeiss Axio Cam, Carl Zeiss, Oberkochen) und passender Software (Axio Version 3.1) in 1,25x Vergrößerung. Die Messwerte wurden in Anlehnung an die Empfehlung der amerikanischen Gesellschaft für „Bone and Mineral Research“ angegeben (Parfitt et al., 1987). Ausgemessen wurden, wie in

Abb. 11 dargestellt, Kallusdurchmesser und Femurdurchmesser, woraus der Quotient (%) gebildet wurde, die Frakturspaltbreite (mm) und die periostale Kallusfläche (mm²) mit Berechnung des prozentualen Anteils an Knochen (%), Knorpel (%) oder Bindegewebe (%). Die periostale Kallusfläche (ROI) definierte sich als Fläche 2mm proximal und distal der Osteotomie in axialer Richtung und radial begrenzt von den Außengrenzen des Kallus.

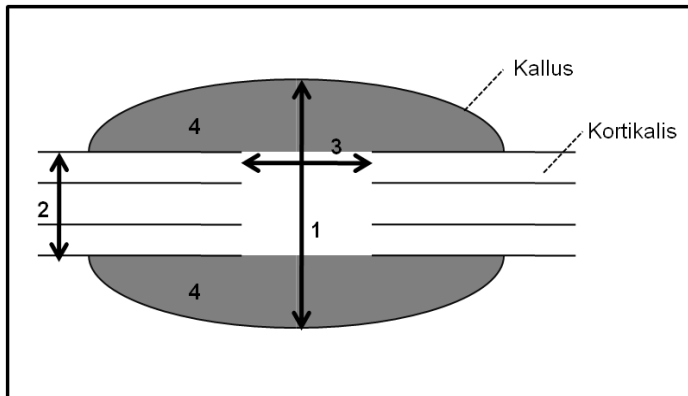


Abb. 11.: Schematische Skizze der histologischen Auswertungsparameter mit Kallusdurchmesser (1), Femurdurchmesser (2), Frakturspaltbreite (3) und periostaler Kallusfläche (4).

Die Entwicklung eines Punkte-Systems (Garcia et al., 2008a) ließ die Beurteilung des Fortschritts und der Qualität der Frakturspaltheilung zu. Bewertet wurden immer beide Kortices mit jeweils zwei Punkten bei Überbrückung des Frakturspalts mit Knochen, ein Punkt bei Knorpel und null Punkte bei bindegewebiger Überbrückung des Frakturspalts. Insgesamt konnten so maximal vier Punkte bei kompletter knöcherner Überbrückung erreicht werden konnten.

Immunhistochemie

Die Entparaffinisierung der Gewebeschnitte erfolgte mit Xylol und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Die endogene Peroxidase wurde mit H₂O₂-Lösung (3%, 10min Einwirkzeit) geblockt. Nachdem die unspezifischen Bindungsstellen mit PBS und normalem Ziegen Serum geblockt wurden, konnten die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Antikörper und danach eine Stunde mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert werden.

„Angiotensin-Converting“-Enzym

Der immunhistochemische Nachweis von ACE erfolgte mit einem polyklonalen anti-Maus-ACE-Antikörper (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA). Ein Meerrettichperoxidase-markierter Kaninchen-Anti-Ziege-Antikörper diente als Sekundärantikörper.

Vaskularisation

Um die Vaskularisation im Kallusgewebe immunhistochemisch nachzuweisen, wurde eine CD31-Färbung durchgeführt. CD31, auch als PECAM-1 bezeichnet, ist ein integrales Membranprotein, welches der Immunglobulinsuperfamilie angehört und spezifisch auf adulten sowie embryonalen Endothelzellen exprimiert wird (DeLisser et al., 1994). Als Primärantikörper verwendete man einen Anti-Maus-CD31-Antikörper von der Ratte (1:25, BD Bioscience Pharmingen, USA). Ein meerrettichperoxidasemarkierter Ziege-Anti-Ratte Antikörper (1:100, Dianova, Hamburg) wurde als Sekundärantikörper gewählt. Als Chromogen zum Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion diente 3,3'-Diaminobenzidin.

Nach dem Gegenfärben mit Hämalaun nach Mayer konnten die Schnitte lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Dazu wurden periostal auf jeder Seite des Kallus jeweils die positiven Signale in 6 ‚high power fields‘ (HPF) ausgezählt (Abb. 12). Die Ergebnisse wurden dann als Gefäße/HPF dargestellt.

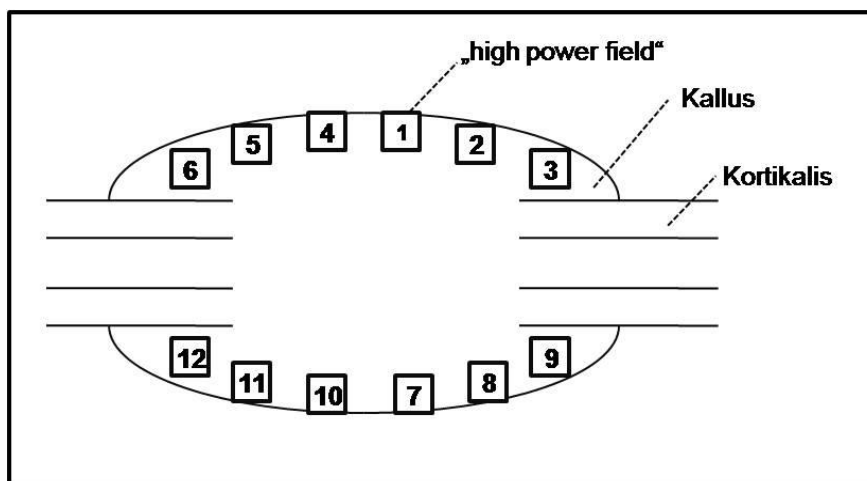


Abb. 12: Schema zur semi-quantitativen Auswertung der CD-31-Färbung. Positive Signale pro, high power field' (HPF).

5.6.5. Mikrocomputertomographie

Die Mikrocomputertomographie diente zur Beurteilung der Frakturheilung mittels Knochendichte- und Knochenvolumenmessung im Frakturkallus sowie zur Bestimmung der frakturfernen Knochendichte in den Perindopril- und Kontrolltieren. Bei den Messungen wurden zuvor in Formalin 4% (Carl Roth & Co.KG, Karlsruhe) fixierte Femora analysiert. Der Knochen wurde mit einer Auflösung von 12µm isotropen Voxel vermessen.

Der Mikrocomputertomograph (µCT40, Scano Medical, Brüttisellen, Schweiz), ausgestattet mit einer 5µm Mikrofokusröhre als Strahlenquelle, arbeitete mit 70kV, 114µA und einer Scanzeit von 200ms. Die Längsachse des Femurs war orthogonal zur Strahlenrichtung orientiert. Die zweidimensionalen CT-Bilder wurden in einer 1024x1024 Matrix aus 500 Schichtbildaufnahmen rekonstruiert.

Um den Heilungsprozess der Fraktur beurteilen zu können, wurde der Bereich innerhalb eines 2,5mm langen Quaders der osteotomierten Region des Femurs untersucht. Die Bestimmung der frakturfernen Knochendichte wurde durch Messungen in der distalen Metaphyse, die Spongiosa mit eingeschlossen, erfasst. Damit die gemessenen Abschnitte miteinander vergleichbar waren, wurde die Dichte auf einer definierten Länge von 1mm proximal der tibialen Wachstumsplatte gemessen. Zur Berechnung dieser Fläche wurde schichtbildweise die zu messende Region in 2D mit Hilfe eines halbautomatischen Zuordnungsalgorithmus markiert.

Aus den Daten ermittelte man das Knochenvolumen (BV in mm³) und die Knochendichte im Kallus (BMD in mgHA/cm³) des osteotomierten Bereiches. Am linken, unfrakturierten Bein wurden zur Beurteilung frakturspaltfernen Knochendichte die Dichte (mgHA/cm³) im gesamten Femurquerschnitt (BMD_{all}), im Spongiosaquerschnitt (BMD_{trab}) und in den inneren 50% der Spongiosa (BMD_{trab50%}) in der distalen Femurmetaphyse gemessen (Abb. 13).

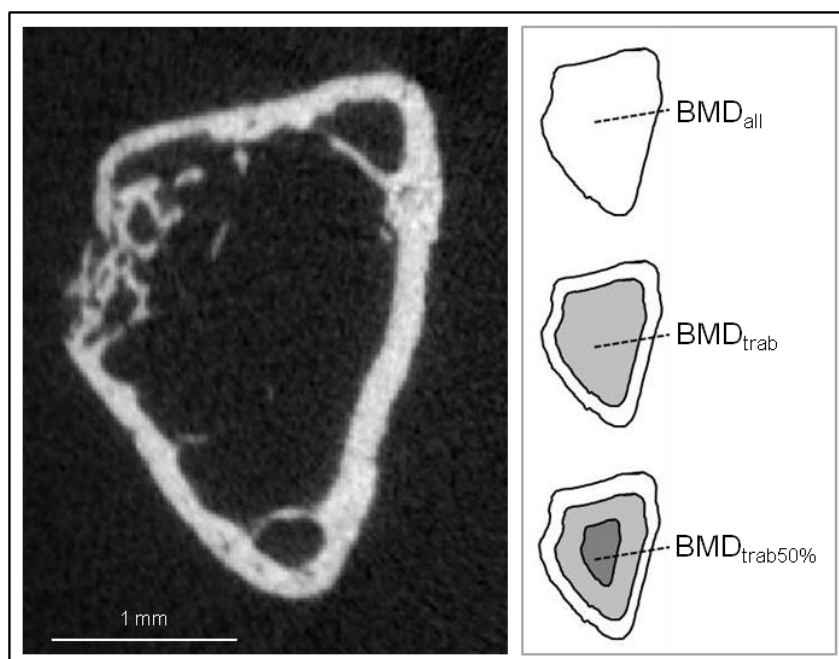


Abb. 13: Mikrocomputertomographischer Querschnitt durch die distale Metaphyse des unfrakturierten Femurs zur Bestimmung von Knochendichte im gesamten Femurquerschnitt (BMD_{all}), Knochendichte in der Spongiosa (BMD_{trab}) und Knochendichte in den inneren 50% der Spongiosa ($BMD_{trab50\%}$).

5.6.6. Western-Blot

Das Western- oder Immunoblotting diente als quantitative Methode zur Ermittlung der Proteinexpression im Kallusgewebe. Zunächst wurden die extrahierten Proteine in einer vertikalen Gelmatrix im elektrischen Feld aufgetrennt. Dann transferierte man die resultierenden Proteinbanden in einer zweiten horizontalen Elektrophorese vom Gel auf eine proteinbindende Membran. Anschließend markierte man die spezifischen Targetproteine durch Färbung mit einem entsprechenden primären Antikörper, gefolgt von einem enzym-konjugierten sekundären Antikörper und detektierte die Stärke der Proteinexpression über eine lichtemittierende Enzym-Substrat-Reaktion auf einem Röntgenfilm. Die gewonnenen Proteinextrakte mussten auf eine identische Proteinkonzentration eingestellt werden, um die Proteinexpression verschiedener Proben bei gleicher Beladung der Geltaschen und gleichmäßigem Gel-Membran-Transfer quantitativ vergleichen zu können. Die Absicherung der Quantifizierbarkeit wurde weiterhin durch das Mitführen eines ubiquitär konstitutiv exprimierten Proteins (β -Actin oder α -Tubulin) gewährleistet, das in allen zu vergleichenden Ansätzen die gleiche Expressionsstärke aufweisen musste.

Proteinextraktion

Da die Proben aus einem hohen Knochen- und Knorpelanteil bestanden, wurden alle verwendeten Proben zunächst in einem Handhomogenisator zerkleinert.

Die Proben wurden mit je 150µl vorgekühltem Lysis Puffer, Proteaseinhibitor Cocktail (Sigma) 1:75 und 100mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1:75 mit ca. 20 Auf- und Abwärtsbewegungen homogenisiert. Die Proben mussten anschließend mit Micra für 20min homogenisiert werden. Danach wurden die Proben für 30min auf Eis inkubiert und für 30min bei 13000U/min und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau). Im Anschluss konnten die Überstände abpipettiert und Aliquots der gewonnenen Proteinextrakte bei minus 20°C kryokonserviert werden.

Proteinkonzentrationsbestimmung und Denaturierung

Die aus der Proteinextraktion gewonnenen Extrakte wurden mit A. dest auf 1:10 verdünnt. Die Messlösungen wurden unmittelbar vor der Bestimmung frisch angesetzt. Dazu wurden 5ml von Reagenz A (10g Na₂CO₃/500ml 0,1M NaOH, Roth) mit 100µl Reagenz B (0,5g KNa-Tartrat, 0,25g Cu-Sulfat*5H₂O/50 ml A. dest, Merck) vermischt. Zu 250µl dieser Lösung setzte man je 50µl der verdünnten Extrakte zu und mischte 10 Sekunden intensiv (Vortex, Heidolph reax top, Fisher Scientific). Danach wurden die Proben für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Den Proben wurde nach der Inkubation 25µl einer Lösung auf 1:2 mit A. dest verdünnter Folin & Ciocalteu's Phenol-Reagenz (Sigma) hinzugefügt, um sie danach sofort intensiv 10 Sekunden lang zu durchmischen (Vortex). Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption des entstandenen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 595nm gegen A. dest photometrisch (GeneQuant pro, Amersham pharmacia biotech, Freiburg, BRD) gemessen. Mit Hilfe einer BSA (Bovine Serum Albumin)-Standardkurve ermittelte man die Proteinkonzentration. Zu jedem Proteinextrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Extrakte wurden auf gleiche Proteingehalte (13,5µg/15µl) eingestellt und mit Laemmli Puffer (Sigma) 2 x 5min im kochenden Wasserbad denaturiert.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Western-Blot-Analysen wurden als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter diskontinuierlichen Bedingungen nach (Laemmli, 1970) mit einer Acrylamidkonzentration von 5% im Sammelgel und einer Acrylamidkonzentration von 10% im Trenngel durchgeführt (30% Acrylamid/ Bis Solution, 29:1, BioRad, München; Tab. 1)

Zusätze	Sammelgel 5 %	Trenngel 10 %
30% Acrylamid/Bis	0,67ml	3,30ml
Trenngelpuffer		2,50ml
Sammelgelpuffer	0,50ml	
A. dest	2,70ml	4,00ml
10% SDS	0,04ml	0,10ml
10% APS	0,04ml	0,10ml
TEMED	0,02ml	0,02ml

Tab. 1: Zusammensetzung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Sammel- und Trenngele.

Die Gele wurden in einer vertikalen Flachapparatur mit Gießstand für Minigele (Mini-Protean II, BioRad) nach Anleitung des Herstellers gegossen. Damit eine Hemmung der Polymerisation an der Geloberfläche durch Sauerstoff verhindert wurde und die Ausbildung einer glatten Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel gegeben war, wurde nach dem Einfüllen der Trenngellösung vorsichtig ca. 200µl Isopropanol (Roth) überschichtet. Nachdem das Gel eine Stunde polymerisiert und der Alkohol entfernt wurde, goss man das Sammelgel in die Apparatur. Mit einem zentriert ins Sammelgel eingesteckten Teflonkamm (15 Zähne, 4mm x 1cm x 0,75mm, BioRad) bildete man Geltaschen, die ein maximales Beladungsvolumen von 15µl zuließen. Nach einer Stunde Polymerisierung wurden 15µl der Proben in die Geltaschen aufgetragen. Nach Beladung des Gels wurde die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II) in einem TRIS/Glycinpuffer (0,125M TRIS Base; 0,96M Glycin; 0,5% SDS, Roth) durchgeführt. Um die erforderliche Niederspannung zu erhalten, wurde ein spezielles Netzgerät für stabilisierten Gleichstrom (Power Pac, BioRad) verwendet. Es wurde eine anfängliche Spannung von 100V gewählt, um die Proteine im

Sammelgel zu konzentrieren. Diese wurde nach 15min auf 140V für ca. 1 Stunde zur Passage des Trenngels erhöht. Nachdem die blaue Lauffront der Bromphenolblau-Bande des „Sample Buffers“ das untere Gelände erreichte, wurde die Auftrennung der Proteine beendet.

Nach der Entnahme der Gele aus der Kammer, wurden diese in einem Transferpufferbad (12mM TRIS Base, 96mM Glycin, Roth) für das anschließende Membranblotting äquilibriert.

Blotting

Für die Durchführung des horizontalen Proteintransfers wurde eine Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) zum Tankblotting verwendet. Um Oberflächenladungen auszugleichen, wurde die PVDF-Membran (0,2µm Porengröße, BioRad) für 20 Sekunden in Methanol (Roth) gebadet und direkt danach mit A. dest abgespült. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Äquilibration in Transferpuffer (12mM TRIS Base, 96mM Glycin in A. dest). Der Aufbau des Blot-Sandwiches sah folgendermaßen aus: Nachdem ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm in die Blotkassette eingelegt wurde, wurde darauf ein getränktes Filterpapier (Whatman, Schleicher & Schüll, Dassel) platziert. Darüber wurden die äquilibrierte PVDF-Membran und das Gel luftblasenfrei positioniert, und wiederum ein getränktes Filterpapier und ein Schwamm eingelegt. Die Sandwichkassette wurde nach dem Verschließen so in der Blotkammer ausgerichtet, dass der Stromfluss einen Proteintransfer vom Gel zur Membran gewährleistete. Zur Vermeidung lokaler Überhitzungen und zur Erhaltung einer gleichmäßig niedrigen Temperatur wurde ein Eis-„Spacer“ in die Blotkammer eingestellt und auf einem Magnetrührer gearbeitet. Nachdem die Blotkammer vollständig mit Transferpuffer aufgefüllt war, wurden die Elektroden am Netzgerät für stabilisierenden Gleichstrom angeschlossen. Nach 2 Stunden bei einer angelegten konstanten Spannung von 50V (Anfangsstromstärke 800mA/ 2 Gele) wurde der Proteintransfer beendet. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in TBS-T Puffer (1,5mM TRIS Base pH 7,5; 1% NaCl; 0,01% Tween 20 (Roth) in A. dest) bei 4°C zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

Detektion

Die Detektion der Targetproteine erfolgte durch eine spezifische Antikörperfärbung der membrantransferierten Proteine. Alle Handhabungen zur Antikörperfärbung der Membranen wurden auf einem Horizontalschüttler (Heidolph Polymax 1040, Fisher Scientific) durchgeführt. Die über Nacht in TBS-T aufbewahrten Membranen wurden vor der Saturierung noch dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in einer 5%igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, BioRad) in TBS-T für 30min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurden die entsprechenden Primärantikörper für 180min bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 2).

Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation mit HRP-konjugiertem Schaf-anti-Maus-IgG (DAKOCytomation) bzw. Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Amersham pharmacia biotech), die in einer 1:5000 Verdünnung verwendet wurden. Die Membranen wurden nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur fünfmal in TBS-T gewaschen und anschließend der Chemilumineszenzreaktion unterzogen (ECL Western Blotting Analysis System, Amersham).

Die behandelten Membranen wurden zur Exposition eines Röntgenfilmes (Hyperfilm ECL, Amersham pharmacia biotech) in einer Röntgenkassette positioniert. Um die Signale der belichteten Filme sichtbar und haltbar zu machen, wurden sie in Entwicklungs- und Fixierungsbädern behandelt.

Quantitative Auswertung

Die Röntgenfilme wurden mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und dem Quantifizierungsprogramm ‚Quantity One‘ (BioRad). Die quantitative Analyse der Proteinmuster erfolgte als Vergleich der relativen Mengenverhältnisse der einzelnen Fraktionen durch densitometrische Bestimmung der Lichtabsorption, indem die optische Dichte der Banden über die Fläche ihrer Ausdehnung gemessen wurde. Die ermittelten Daten wurden über den internen β -Actin/ α -Tubulin-Standard korrigiert.

Primär-Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung/ Inkubation	Charakteristik
ACE	Santa Cruz	1:500 3h RT	„Angiotensin-Converting“-Enzym
AT₁-R	Santa Cruz	1:100 3h RT	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT₂-R	Santa Cruz	1:50 3h RT	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
„cleaved“ Caspase-3	Cell Signaling Technology	1:200 3h RT	Apoptose-Schlüssel- Executionsprotease
PCNA	DAKOCytomation	1:250 3h RT	Co-Faktor der DNA-Polymerase- δ in S-Phase, assoziiert mit DNA-„Repair“
VEGF	Santa Cruz	1:100 3h RT	Angiogener Wachstumsfaktor
Cyr61	Santa Cruz	1:100 3h RT	Angiogenese-Induktor
β-Actin	Sigma	1:20000 3h RT	Zytoskelettmarker
α-Tubulin	Sigma	1:1000 3h RT	Zytoskelettmarker

Tab. 2: Auflistung der für die Western-Blot-Analysen verwendeten Antikörper.

Als interner Standard wurde zur Kontrolle der Proteinbeladung und des Proteintransfers ein β -Actin- bzw. α -Tubulin-Antikörper (Sigma) verwendet.

Wegen seiner konstanten intrazellulären Verteilung und als eines der stark konservierten eukaryotischen Proteine kann β -Actin/ α -Tubulin als Proteinkonzentrationsstandard eingesetzt werden. Daher wurde die densitometrisch

ermittelte optische Dichte auf gleiche β -Actin/ α -Tubulin-Konzentrationen korrektgerechnet.

5.6.7. ELISA

Parathormon (PTH) ist ein Polypeptidhormon, bestehend aus 84 Aminosäuren, welches von der Nebenschilddrüse produziert wird. Mit der biologisch aktiven N-terminalen Region ist es hauptsächlich an der Steuerung des Kalziumhaushaltes beteiligt (Talmage and Mobley, 2008).

PTH wurde mit Hilfe eines immunenzym-metrischen Assays („Mouse Intact PTH ELISA Kit“, Immuntopics, San Clemente, Canada) quantitativ bestimmt. Dieser funktionierte nach dem 1-Schritt Sandwichprinzip. Hierzu wurde das entnommene Blut 3min bei 3000U/min zentrifugiert und das benötigte Serum abpipettiert.

Von der jeweiligen Serumprobe wurden 25 μ l zusammen mit einem Gemisch aus biotinyliertem, monoklonalem anti-PTH Mausantikörper und einem, an meerrettichperoxidasegekoppelten, anti-PTH Mausantikörper in ein mit Streptavidin-beschichtetes Reaktionsgefäß gefüllt und bei Raumtemperatur drei Stunden inkubiert. Über das Biotin wurde der biotinylierte Antikörper an die Wand des Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäßes gebunden. Durch den zweiten meerrettichperoxidasemarkierten Antikörper entstand folgender Sandwichkomplex: biotinylierter anti-Mausantikörper – intaktes PTH – meerrettichperoxidasemarkierte PTH-Mausantikörper.

Nach dem Entfernen des ungebundenen Antikörpers durch einen fünfmalig wiederholten Waschgang wurde die Farbreaktion mit 100 μ l von einem Gemisch aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid entwickelt. Am Ende der 30-minütigen Inkubationszeit konnte die Extinktion nach dem Stoppen der Farbreaktion gemessen werden. Die enzymatische Aktivität des Antikörperkomplexes war direkt proportional der Menge an PTH in der Probe. Die PTH-Konzentrationen konnten aus der zuvor aus den Standardproben ermittelten Kalibrationskurve abgelesen werden. Die Messungen wurden in einem automatisierten Analyser durchgeführt (Digiscan, Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich).

5.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die analysierten Daten in den einzelnen Tests wurden auf Normalverteilung hin untersucht. Bei Normalverteilung (normality test $\alpha=0,05$) wurde zur parametrischen Signifikanzbestimmung von zwei Gruppen der Students t-Test verwendet. Zur Signifikanzbestimmung zwischen mehr als zwei Gruppen wurde ein one-way ANOVA-(Neuman-Keul) Test durchgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an.

6. ERGEBNISSE

6.1. Perioperative Komplikationen

Insgesamt wurden für die Studie 139 CD-1-Mäuse operiert. Davon mussten 19 Mäuse von der Studie ausgeschlossen werden. Im Einzelnen zeigten sich 11 Pin-Dislokationen (7,9%), 5 Narkosekomplikationen (3,6%), 2 Infektionen (1,4%) und eine Femurzersplitterung während der Operation (0,72%). Folglich flossen 120 Tiere in die Auswertung ein.

6.2. Gewicht, Blutdruck und Herzfrequenz

Das Gewicht der Mäuse zum Operationszeitpunkt war in allen Gruppen vergleichbar. Die Tiere zeigten eine adäquate Gewichtszunahme im Verlauf (Tab. 3).

	ACE-I präoperativ	Kontrolle präoperativ	p-Wert	ACE-I bei V-Ende	Kontrolle bei V-Ende	p-Wert
2 Wochen	32,3±0,5	35,1±0,4	n.s.	32,9±0,7	33,8±0,5	n.s.
5 Wochen	34,9±0,9	33,4±0,7	n.s.	36,9±1,1	36,9±1,0	n.s.
10 Wochen	33,5±0,9	32,9±0,5	n.s.	39,3±0,7	37,4±0,7	n.s.

Tab. 3: Gewicht [g] der Mäuse vor Operation und bei Versuchsende (V-Ende) nach 2, 5 und 10 Wochen in ACE-Inhibitor- (ACE-I) und Kontrollgruppe (Kontrolle). Mittelwert±SEM.

Die Behandlung der Versuchstiere mit dem ACE-Inhibitor ging mit einem signifikant niedrigeren mittleren arteriellen Druck, gemessen in der A. carotis, einher (Tab. 4). Die Herzfrequenz lag für alle Mäuse im physiologischen Bereich zwischen 151 und 210 Schlägen pro Minute, wobei sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede der Herzfrequenz zeigten (Tab. 4).

		ACE-I	Kontrolle	p-Wert
Blutdruck [mmHg]	2 Wochen	56,0±5,8	84,0±7,8	p=0,0205
	5 Wochen	63,1±6,3	91,3±5,7	p=0,0051
	10 Wochen	66,3±4,6	89,4±5,8	p=0,0074
Herzfrequenz [l/min]	2 Wochen	151,2±17,2	210,2±27,9	p=0,0718
	5 Wochen	210,0±30,6	163,0±15,2	p=0,1904
	10 Wochen	166,3±20,0	157,7±10,3	p=0,7100

Tab. 4: Herzfrequenz [l/min] und mittlerer arterieller Druck [mmHg] bei Versuchsabschluss nach 2, 5 und 10 Wochen, gemessen mittels intraarteriellen Karotiskatheters in ACE-Inhibitor- (ACE-I) und Kontrollgruppe (Kontrolle). Mittelwert±SEM.

6.3. Konventionelle Radiologie

6.3.1. Kallus-/Femurdurchmesser der radiologischen Auswertung

In der mit ACE-Inhibitor Perindopril behandelten Gruppe war nach 2 Wochen eine Tendenz in Richtung eines radiologisch größeren Kallusdurchmessers erkennbar (111,3±4,0% vs. 104,2±2,1%; p=0,1414; Abb. 14A,B und Abb. 15). Nach 5 Wochen zeigte sich kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen (139,7±4,6% vs. 134,1±9,6%; p=0,5685; Abb. 14C,D und Abb. 15), wohingegen nach 10 Wochen die ACE-Inhibitor-Tiere einen tendenziell geringeren Kallusdurchmesser verglichen mit den Kontrolltieren aufwiesen (124±5,11% vs. 137,3±4,54%; p=0,0637; Abb. 14E,F und Abb. 15).

In der ACE-Inhibitor-Gruppe fand sich zwischen der 5. Woche und der 10. Woche eine signifikante Abnahme des Kallusdurchmessers (139,7±4,6% vs. 124,0±5,1%; p=0,0282), welche in der Kontrollgruppe nicht beobachtet werden konnte (Abb. 15).

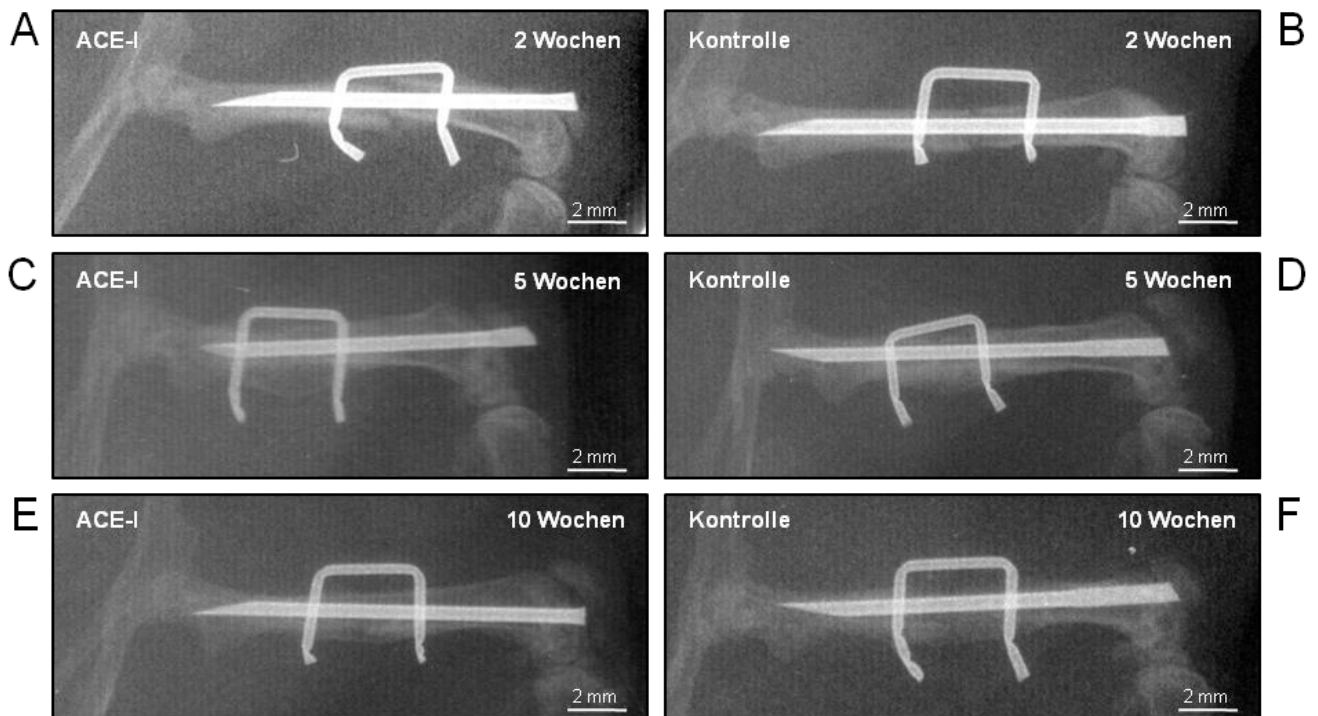


Abb. 14: Repräsentative Röntgenbilder der rechten Femora 2, 5 und 10 Wochen nach Osteotomie in ACE-Inhibitor- (ACE-I) und Kontrollgruppe (Kontrolle).

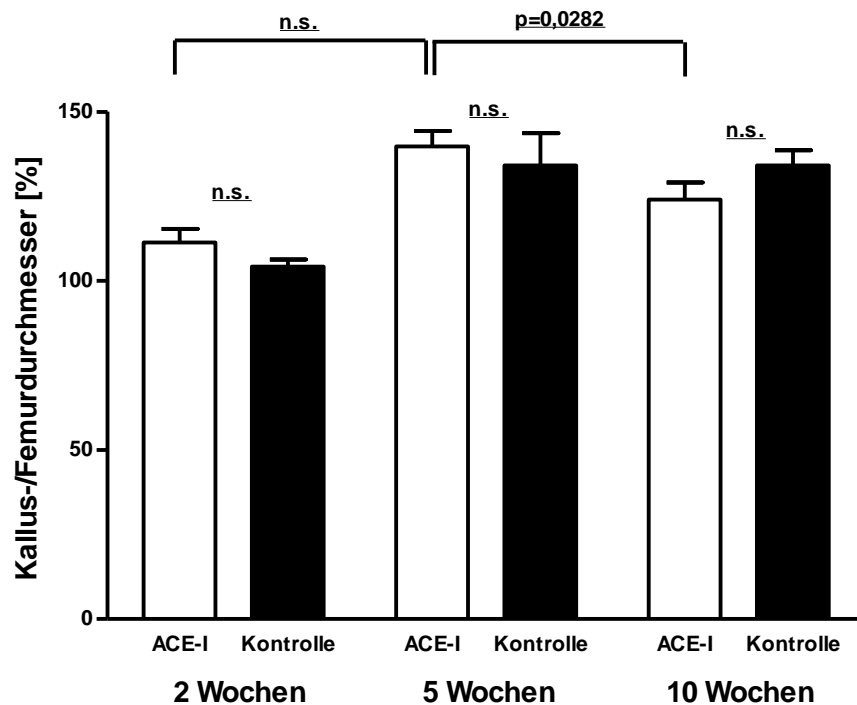


Abb. 15: Darstellung des Quotienten aus radiologischem Kallus- und Femurdurchmesser angegeben in Prozent des nicht-osteotomierten Femurs. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert±SEM.

6.3.2. Goldberg-Klassifikation

In der radiologischen Beurteilung der Frakturheilung mittels Goldberg-Score zeigten sich zu keinem der drei Beobachtungszeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen ACE-Inhibitor- und Kontrolltieren (Abb. 16).

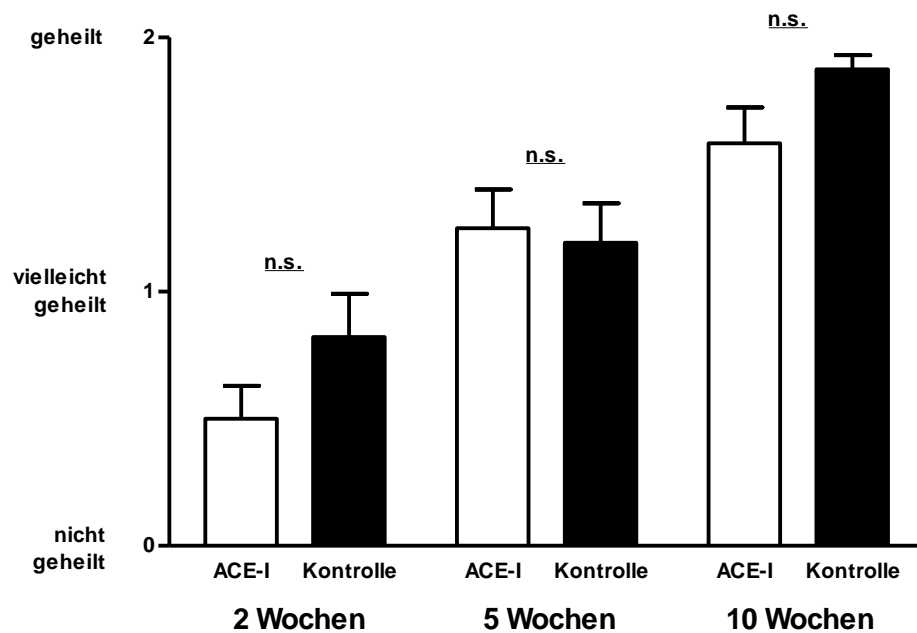


Abb. 16: Bewertung des Grades der radiologischen Frakturheilung nach der Goldberg-Klassifikation in der ACE-Inhibitor-(□) verglichen mit der Kontrollgruppe (■). Der Punktwert ist mit null Punkten für "nicht geheilt", einem Punkt für "potenziell geheilt" und zwei Punkten für "geheilt" angegeben. Mittelwert±SEM.

6.4. Biomechanik

6.4.1. Maximales Drehmoment

Bei der Messung des maximalen Drehmoments in Prozent des nicht-osteotomierten Femurs zeigte die ACE-Inhibitor-Gruppe nach zwei Wochen ein signifikant größeres Drehmoment als die Kontrollgruppe ($0,3 \pm 0,04\%$ vs. $0,1 \pm 0,03\%$; $p=0,0003$; Abb. 17A). Nach 5 Wochen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wobei die ACE-Inhibitor-Gruppe in der Tendenz immer noch ein höheres Drehmoment aufwies ($97,2 \pm 18,5\%$ vs. $65,4 \pm 12,6\%$, $p=0,1762$; Abb. 17B). 10 Wochen nach der Osteotomie zeigten beide Gruppen ein ähnlich großes Drehmoment ($80,3 \pm 8,2\%$ vs. $85,2 \pm 6,6\%$; $p=0,6519$; Abb. 17C).

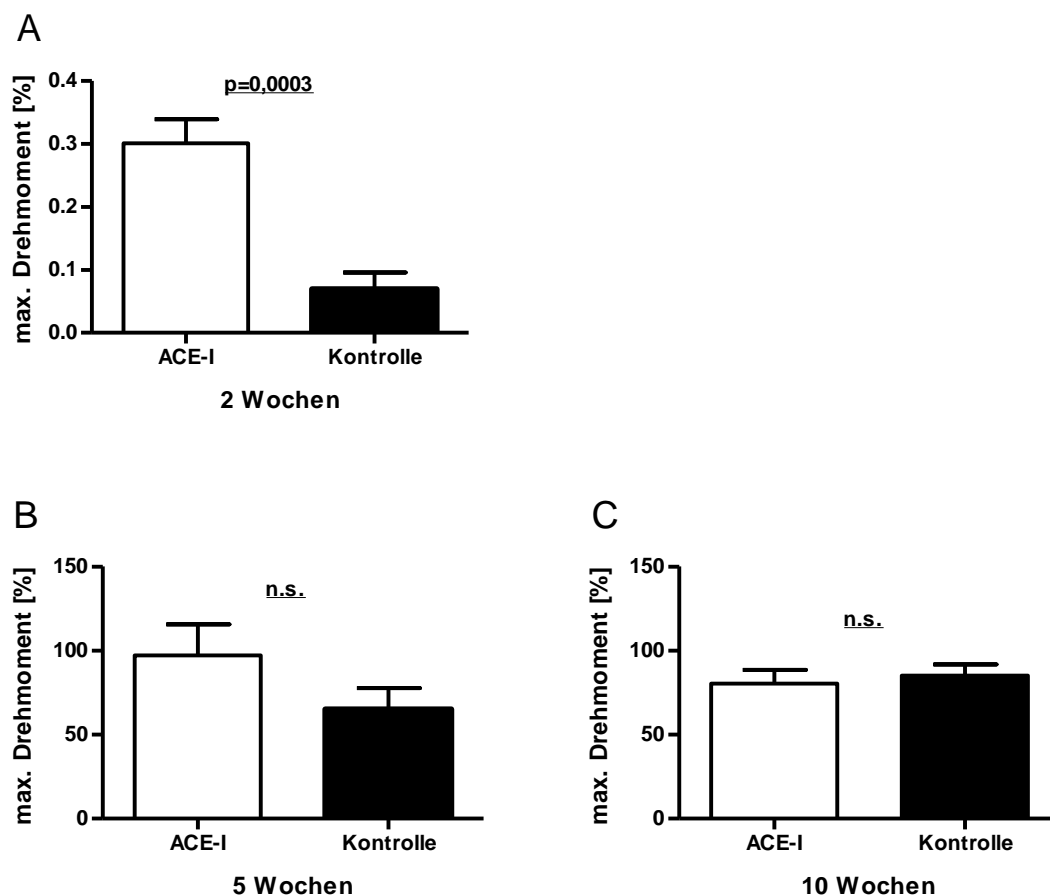


Abb. 17: Maximales Drehmoment nach 2 (A), 5 (B) und 10 Wochen (C) angegeben in Prozent des nicht-osteotomierten Femurs. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert \pm SEM.

6.4.2. Torsionswinkel an der Stelle des maximalen Drehmoments

Zu keinem der drei Zeitpunkte ergaben sich signifikante Unterschiede im Torsionswinkel zwischen den mit ACE-Inhibitor behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Nach 2 Wochen (Abb. 18A) wurde in der ACE-Inhibitor-Gruppe ein Winkel von $98,8 \pm 16,5\%$ gemessen im Vergleich zu $81,3 \pm 18,9\%$ in der Kontrollgruppe ($p=0,4993$). Zum Beobachtungspunkt nach 5 Wochen (Abb. 18B) konnte für die ACE-Inhibitor-Tiere ein Winkel von $70,4 \pm 6,5\%$ und für die Kontrolltiere $94,9 \pm 17,1\%$ gemessen werden ($p=0,2061$). Zum letzten Beobachtungszeitpunkt nach 10 Wochen (Abb. 18C) waren es $89,5 \pm 18,8\%$ in der ACE-Inhibitor-Gruppe und $82,4 \pm 4,8\%$ in der Kontrollgruppe ($p=0,7226$).

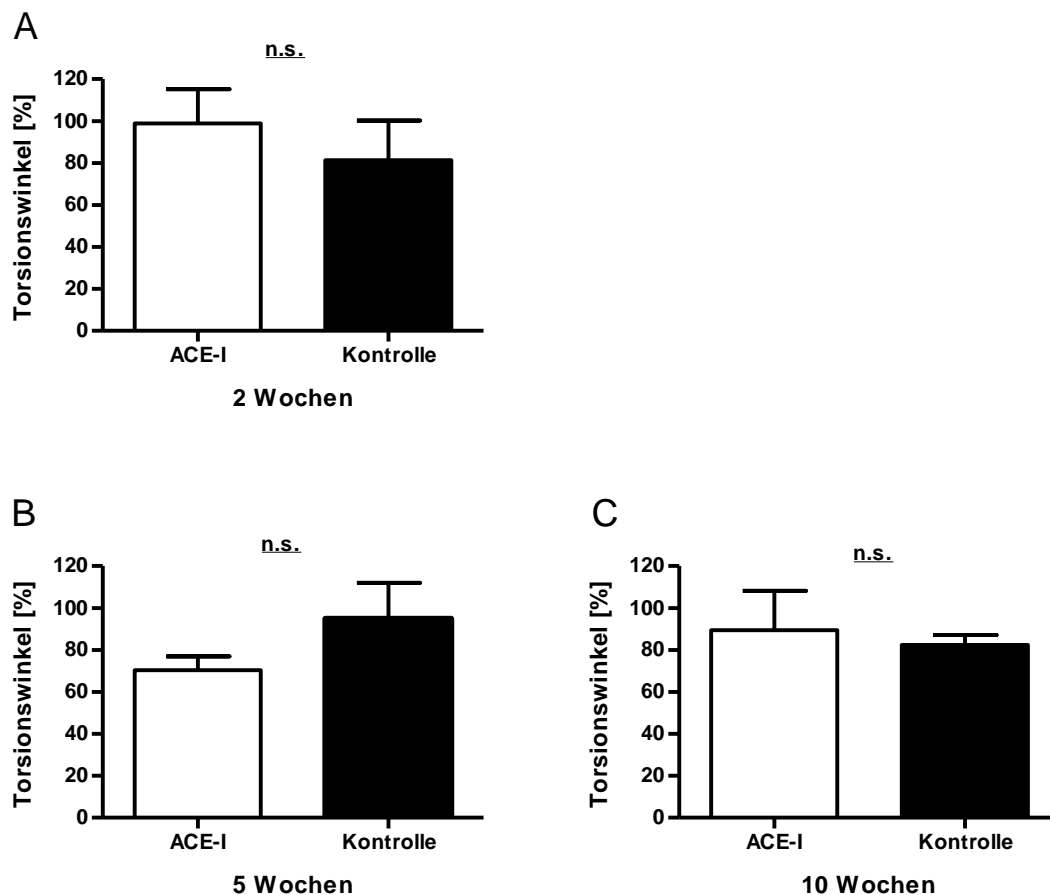


Abb. 18: Torsionswinkel an der Stelle des maximalen Drehmoments nach 2 (A), 5 (B) und 10 Wochen (C) angegeben in Prozent des nicht-osteotomierten Femurs. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert \pm SEM.

6.4.3. Torsionssteifigkeit

Nach 2 Wochen ($0,5 \pm 0,2\%$ vs. $0,1 \pm 0,04\%$; $p=0,0686$) und nach 5 Wochen ($148,1 \pm 35,1\%$ vs. $74,5 \pm 13,0\%$; $p=0,0727$) wiesen die mit ACE-Inhibitor Perindopril behandelten Gruppen eine tendenziell höhere Steifigkeit auf als das Kontrollkollektiv (Abb. 19A,B), obwohl die gemessenen Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten. Nach 10 Wochen zeigte sich dann kein Unterschied mehr zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($113,6 \pm 21,8\%$ vs. $104,4 \pm 6,9\%$; $p=0,6956$; Abb. 19C).

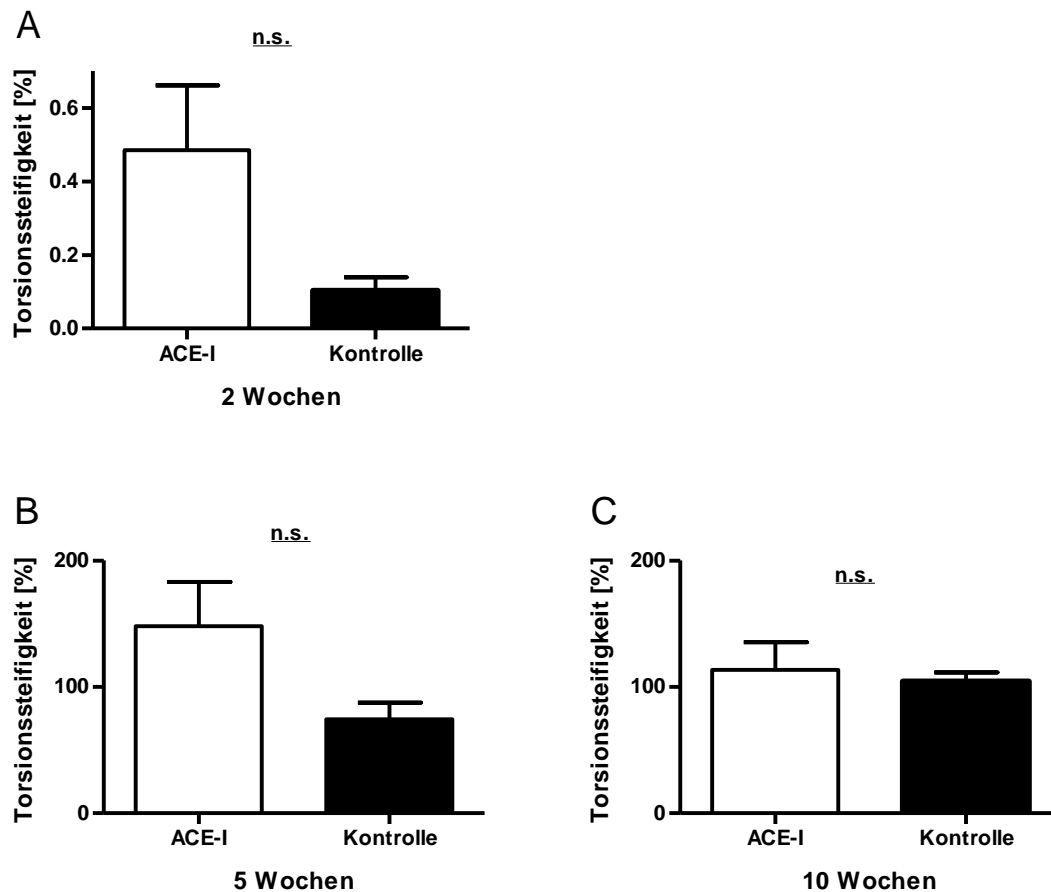


Abb. 19: Torsionssteifigkeit nach 2 (A), 5 (B) und 10 Wochen (C) angegeben in Prozent des nicht-osteotomierten Femurs. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert \pm SEM.

6.5. Histologie und Immunhistochemie

6.5.1. Frakturspaltbreite der histologischen Auswertung

In den histologischen Längsschnitten wurde die Breite des Frakturspalts zwischen den Kortikalisenden ausgemessen (Tab. 5). Zwischen der ACE-Inhibitor- und der Kontrollgruppe bestand nach 2 Wochen noch kein Unterschied, wohingegen 5 Wochen nach Osteotomie der Frakturspalt in der ACE-Inhibitor-Gruppe signifikant kleiner war als in der Kontrollgruppe. Zum 10-Wochen-Beobachtungszeitpunkt war in beiden Gruppen kein Frakturspalt mehr vorhanden, da die Frakturenden vollständig knöchern überbrückt waren.

	ACE-I	Kontrolle		
2 Wochen	0,20±0,03	0,24±0,02	n=8	p=0,2858
5 Wochen	0,01±0,01	0,24±0,06	n=8	p=0,0013
10 Wochen	0±0	0±0	n=8	

Tab. 5: Frakturspaltbreite [mm] gemessen am histologischen Femurlängsschnitt in ACE-Inhibitor- (ACE-I) und Kontrollgruppe (Kontrolle). Mittelwert±SEM.

6.5.2. Kallus-/Femurdurchmesser der histologischen Auswertung

Histologisch wiesen die Tiere, welche mit dem ACE-Inhibitor Perindopril behandelt wurden, nach 2 und nach 5 Wochen eine größere Kallusbildung auf (Abb. 20). Dies zeigte sich in einem signifikant größeren Quotienten aus Kallus- und Femurdurchmesser nach 2 Wochen ($211 \pm 16,1\%$ vs. $151,1 \pm 17,3\%$; $p=0,0231$), wie auch nach 5 Wochen ($164,1 \pm 9,5\%$ vs. $127,8 \pm 8,6\%$; $p=0,0134$). Nach 10 Wochen fand sich kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen ($139,4 \pm 6,0\%$ vs. $137,7 \pm 9,5\%$; $p=0,8863$). In den mit ACE-Inhibitor behandelten Tieren nahm der Quotient aus Kallus- und Femurdurchmesser von der 2. bis zur 10. Woche kontinuierlich ab, was in der Kontrollgruppe so nicht zu beobachten war.

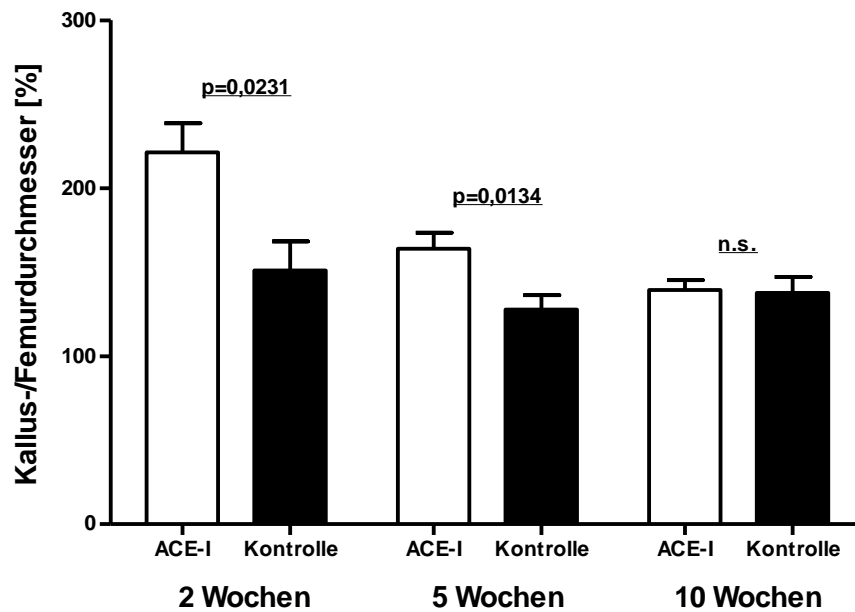


Abb. 20: Darstellung des Quotienten aus Kallusdurchmesser und Femurdurchmesser im histologischen Femurlängsschnitt angegeben in Prozent des nicht-osteotomierten Femurs. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert±SEM.

6.5.3. Periostale Kallusfläche

Bei der Ausmessung der histologischen Längsschnitte (Abb. 21) konnte sowohl nach 2 Wochen ($5,2 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ vs. $2,1 \pm 0,8 \text{ mm}^2$; $p=0,0067$) als auch nach 5 Wochen in den mit dem ACE-Inhibitor Perindopril behandelten Gruppen ($3,2 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ vs. $1,0 \pm 0,4 \text{ mm}^2$; $p=0,0027$) eine signifikant größere periostale Kallusfläche nachgewiesen werden. Nach 10 Wochen bestand kein Unterschied mehr zwischen den Perindopril- und Kontrolltieren ($2,6 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ vs. $2,5 \pm 0,5 \text{ mm}^2$; $p=0,7863$).

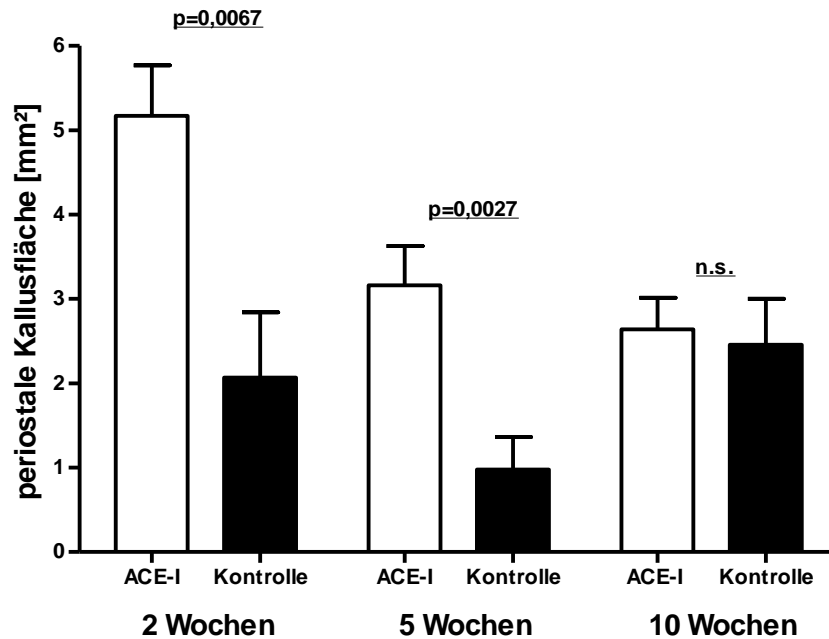


Abb. 21: Darstellung der periostalen Kallusfläche [mm²] im histologischen Femurlängsschnitt. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert±SEM.

6.5.4. Gewebezusammensetzung im Kallus

Nach 2 Wochen war der Kallus aus Knochen, Knorpel und Bindegewebe zusammengesetzt, entsprechend dem Bild einer sekundären Frakturheilung mit enchondraler Knochenbildung nahe des Frakturspalts und intramembranöser Knochenbildung im Bereich des Periosts frakturspaltfern (Abb. 22, Abb. 23). In den mit dem ACE-Inhibitor Perindopril behandelten Tieren ließ sich in der periostalen Kallusfläche tendenziell mehr Knorpel ($40,5 \pm 6,9\%$ vs. $19,9 \pm 9,4\%$; $p=0,0995$) und weniger Bindegewebe ($16,6 \pm 1,7\%$ vs. $43,4 \pm 16,3\%$; $p=0,0597$) nachweisen (Abb. 22). Der Knochenanteil in der ACE-Inhibitor-Gruppe wies nach 2 Wochen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf ($42,9 \pm 7,7\%$ vs. $36,7 \pm 10,4\%$; $p=0,6370$). Nach 5 Wochen unterschieden sich ACE-Inhibitor- und Kontrollgruppe nicht mehr in ihrer Gewebezusammensetzung des Frakturkallus. Zu diesem Zeitpunkt bestand der Kallus in beiden Gruppen überwiegend aus Knochen ($96,4 \pm 3,6\%$ vs. $90,9 \pm 9,1\%$; $p=0,5269$). Der Anteil an Knorpelgewebe war nach 5 Wochen bei den Tieren mit und ohne ACE-Inhibitor-Behandlung deutlich rückläufig ($0,3 \pm 0,3\%$ vs. $0,9 \pm 0,9\%$; $p=0,4213$). Auch der Anteil an Bindegewebe im Kallus hatte sich im Vergleich zum 2-Wochen-Beobachtungszeitpunkt in den mit Perindopril

behandelten Tieren und den Kontrolltieren stark verringert ($3,4 \pm 3,4\%$ vs. $8,3 \pm 8,3\%$; $p=0,5383$). Nach 10 Wochen war der Kallus in beiden Gruppen gänzlich durchbaut und bestand ausschließlich aus Knochengewebe ($100,0 \pm 0\%$ vs. $100,0 \pm 0\%$).

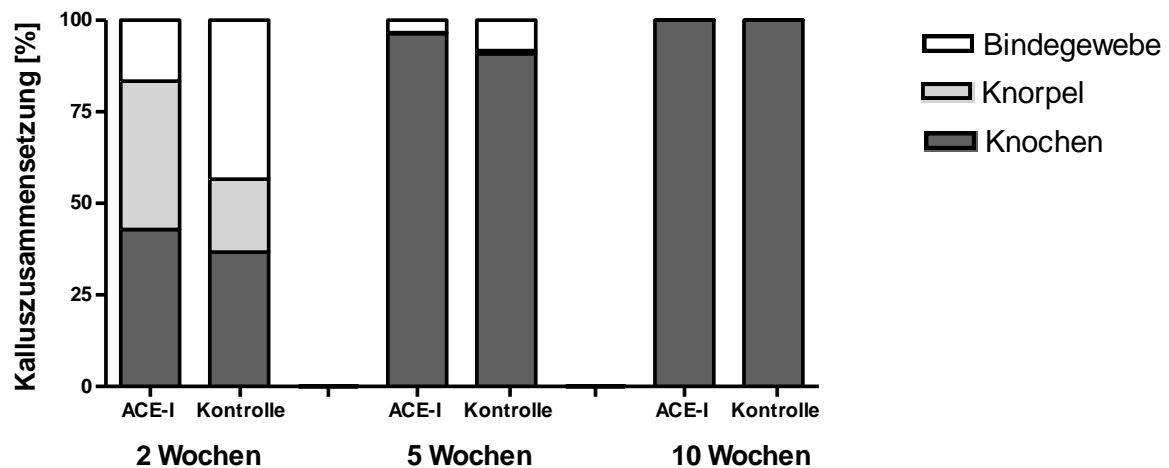


Abb. 22: Gewebezusammensetzung des Kallus im histologischen Längsschnitt in Prozent am Gesamtkallus. ACE-Inhibitor vs. Kontrolle. Mittelwerte.

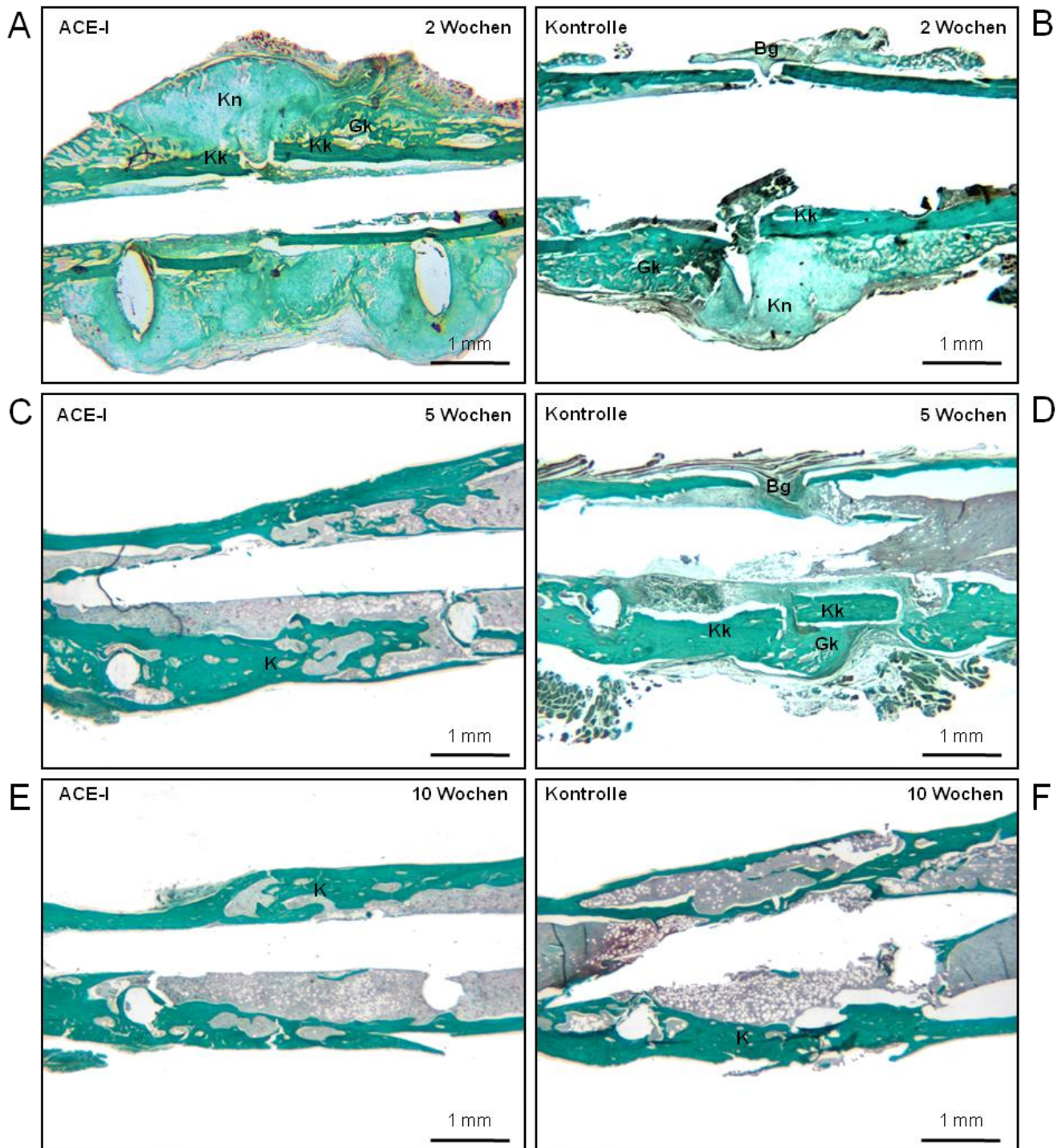


Abb. 23: Repräsentative Darstellung histologischer Femurlängsschnitte im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers in Masson-Goldner-Färbung. 2 Wochen nach Osteotomie zeigte sich nach Therapie mit ACE-Inhibitor (Abb. A) ein größerer Kallus verglichen mit der Kontrolle (Abb. B), bestehend aus Geflechtknochen (Gk), Knorpel (Kn) und Bindegewebe (Bg) im Frakturspaltbereich um die Kortikalis (Kk) im Sinne einer enchondralen Ossifikation. Nach 5 Wochen war unter Behandlung mit dem ACE-Inhibitor (Abb. C) der Frakturspalt bereits mit Knochen (K) durchbaut, wohingegen in der Kontrolle (Abb. D) der Spalt noch teilweise mit Bindegewebe ausgefüllt war. Nach 10 Wochen zeigte sich mit (Abb. E) und ohne ACE-Inhibitor (Abb. F) eine vollständige knöcherne Durchbauung, bei welcher keine Unterscheidung zwischen Kortikalis und Geflechtknochen mehr möglich war.

6.5.5. Histologie-Score

Nach 2 Wochen zeigte sich in der ACE-Inhibitor-Gruppe ein signifikant besserer histologischer Heilungsscore verglichen mit der Kontrollgruppe ($1,3 \pm 0,3$ Pkt vs. $0,3 \pm 0,2$ Pkt; $p=0,0048$). Nach 5 Wochen zeigten Tiere, die mit ACE-Inhibitor behandelt wurden, bereits in 7 von 8 Osteotomien eine knöcherne Überbauung, wohingegen bei den Kontrolltieren die Osteotomieregion nur in 3 von 8 Fällen knöchern durchbaut war. Dies entsprach einem signifikant höheren Punktwert im Score in der ACE-Inhibitor-Gruppe ($3,8 \pm 0,3$ Pkt vs. $2,0 \pm 0,7$ Pkt; $p=0,0256$). Zehn Wochen nach der Osteotomie waren in beiden Gruppen alle Frakturen komplett knöchern überbrückt und wurden dementsprechend mit 4 Punkten bewertet.

(Abb. 24)

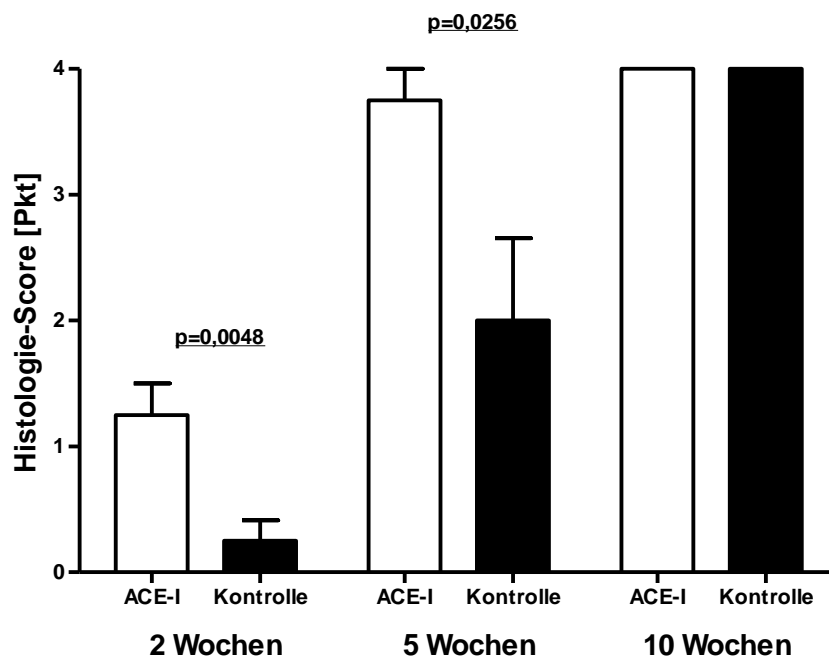


Abb. 24: Darstellung des Histologie-Scores, bei welchem für die qualitative Überbrückung des Frakturspalts oberhalb und unterhalb beider Kortices Punkte [Pkt] vergeben wurden. Bindegewebige Überbrückung des Frakturspalts wurde mit null, knorpelige mit einem und knöcherne mit zwei Punkten bewertet. ACE-Inhibitor (□) vs. Kontrolle (■). Mittelwert \pm SEM.

6.5.6. ACE

In den immunhistochemischen Färbungen der Femurlängsschnitte konnte ACE vor allem in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten im Kallus identifiziert werden (Abb. 25A,B). Auch in der Wachstumsfuge unfrakturierter Femora einer 9 Monate alten CD-1-Maus ließ sich ACE in Osteoblasten nachweisen (Abb. 25C), wohingegen im adulten lamellären Knochen in den Osteozyten kein ACE nachweisbar war (Abb. 25D).

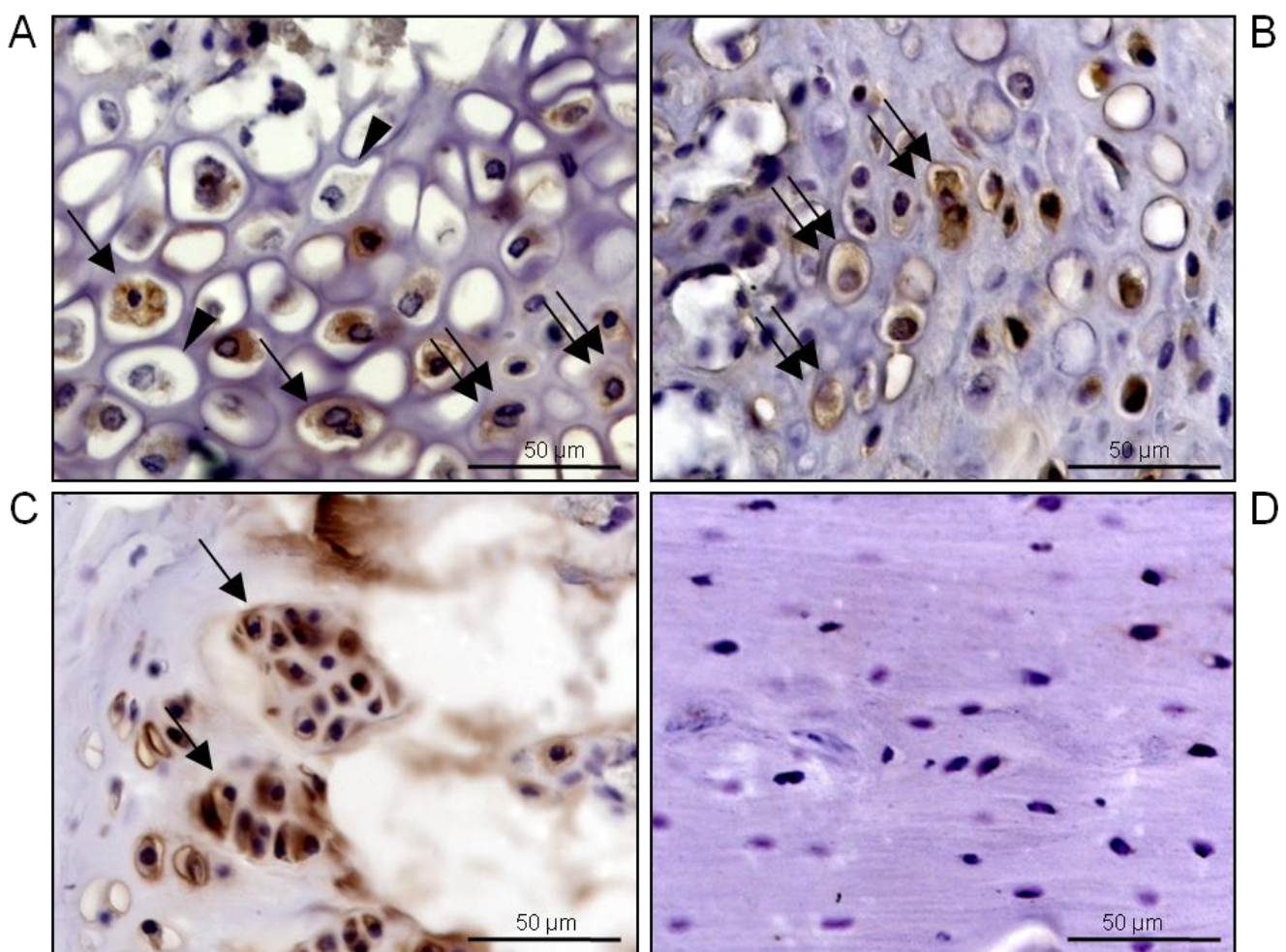


Abb. 25: Repräsentative Darstellung immunhistochemischer Färbungen der Expression von ACE im Femurlängsschnitt von Tieren ohne ACE-Inhibitor-Behandlung. ACE-Expression im periostalen Kallus in Osteoblasten (Doppelpfeil) und hypertrophen Chondrozyten (Pfeil) im Bereich der Knorpelbildung (A). Interessanterweise zeigen nicht alle Chondrozyten eine positive Färbung (Pfeilspitze). ACE-Expression durch Osteoblasten (Doppelpfeile) im periostalen Kallus im Bereich der Knorpelbildung (B). ACE-Expression in der Wachstumsplatte im proximalen Femur durch Osteoblasten (Pfeil) einer 9 Monate alten CD-1-Maus (C). Fehlende ACE-Expression in Osteozyten im Lamellenknochen (D).

6.5.7. Vaskularisierung

Zur Beurteilung der Vaskularisierung während der Frakturheilung wurde das endotheliale Membranprotein CD31 in den Femurlängsschnitten angefärbt. Nach 2 Wochen fanden sich im periostalen Kallus von Tieren, die mit ACE-Inhibitor behandelt wurden, tendenziell mehr Gefäße pro Gesichtsfeld (HPF) verglichen mit den Kontrolltieren ($7,5 \pm 1,5$ vs. $4,4 \pm 0,6$; $p=0,0720$). Dieser Unterschied zeigte jedoch bei einer hohen Standardabweichung keine statistische Signifikanz. Nach 5 Wochen ($3,6 \pm 0,6$ vs. $0 \pm 0,7$; $p=0,6578$) und 10 Wochen ($3,5 \pm 0,6$ vs. $3,1 \pm 0,5$; $p=0,6180$) bestand kein Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen (Abb. 26).

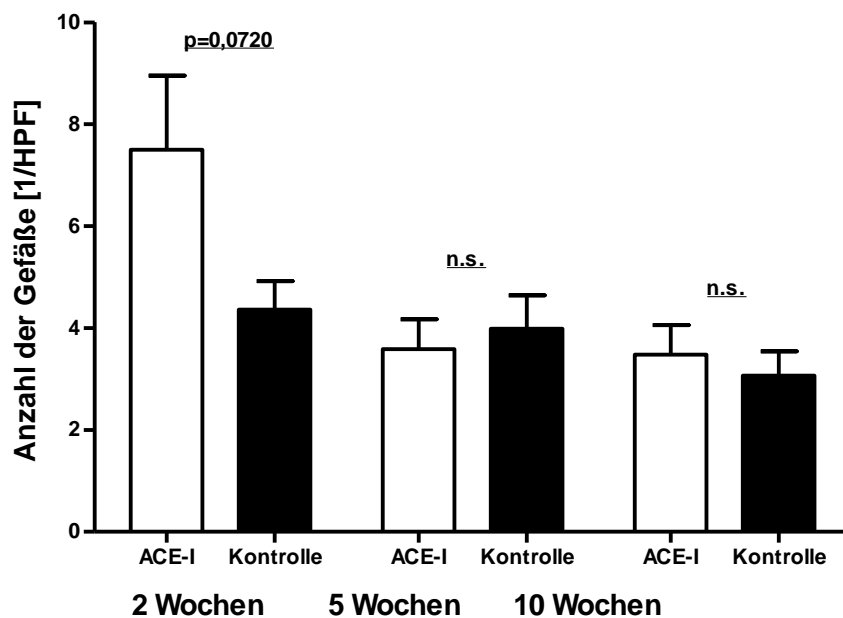


Abb. 26: Gefäßdichte in der immunhistochemischen Auswertung [CD-31 positive Zellen/HPF] in mit ACE-Inhibitor behandelten Tieren (□) bzw. Kontrolltieren (■). Mittelwert±SEM.

6.6. Mikrocomputertomographie

In den mikrocomputertomographischen Aufnahmen (Abb. 27) zeigten die mit dem ACE-Inhibitor Perindopril behandelten Tiere 10 Wochen nach der Osteotomie ein geringeres Volumen an mineralisiertem Knochen (BV_{cal}) im Frakturkallus im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tab. 6). In der Knochendichte (BMD_{cal}) im Frakturkallus unterschieden sich die beiden Gruppen nicht.

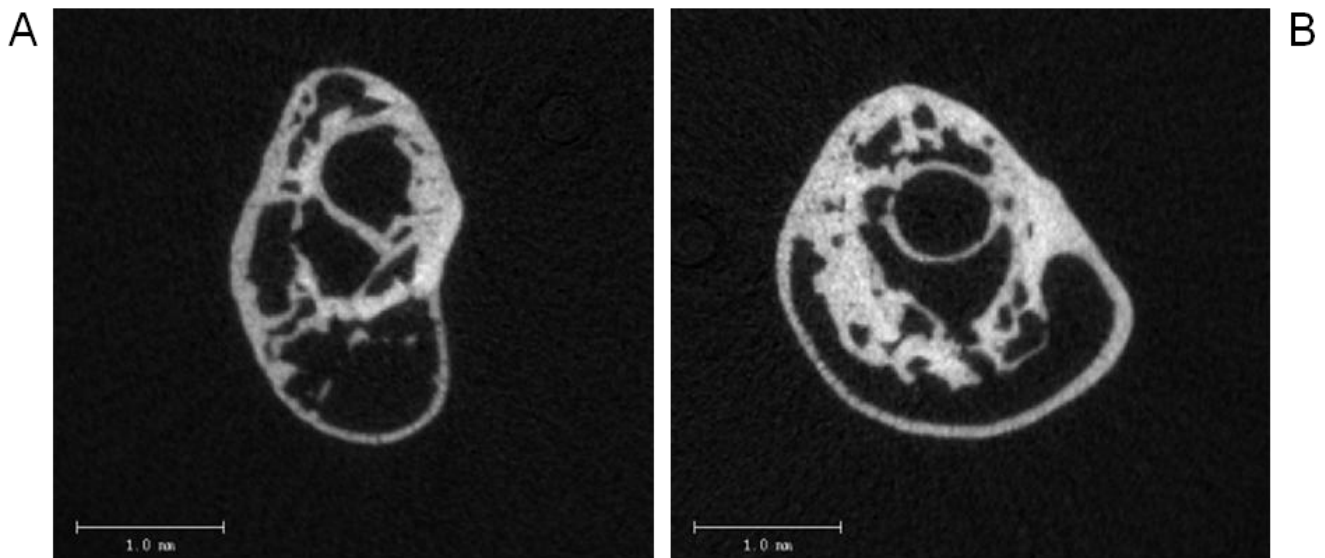


Abb. 27: Repräsentative Darstellung des Kallusquerschnitts im Bereich des maximalen Kallusdurchmessers 10 Wochen nach Osteotomie aus der ACE-Inhibitor- (A) bzw. Kontrollgruppe (B).

		ACE-I	Kontrolle	
BV_{cal}	10 Wochen	3,90±0,24	4,67±0,27	p=0,0547
BMD_{cal}	10 Wochen	1058,00±7,55	1051±10,52	p=0,6016

Tab. 6: Ergebnisse der mikrocomputertomographischen Messungen des Frakturkallus. Knochenvolumen (BV) in [mm³] und Knochendichte (BMD) in [mgHA/cm³] mit ACE-Inhibitor-Behandlung (ACE-I) bzw. ohne (Kontrolle). Mittelwert±SEM.

Die Messung der Knochendichte im gesunden Knochen erfolgte in der linken Femurmetaphyse und zeigte in der ACE-Inhibitor-Gruppe im gesamten Femurquerschnitt (BMD_{all}) und Spongiosaquerschnitt (BMD_{trab}) eine signifikant geringere Knochendichte verglichen mit der Kontrollgruppe. In der Knochendichte in

den inneren 50% der Spongiosa ($BMD_{\text{trab}50\%}$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tab. 7).

		ACE-I	Kontrolle	
BMD_{all}	10 Wochen	327,00 ± 14,06	375,90 ± 16,26	p=0,0422
BMD_{trab}	10 Wochen	318,70 ± 14,27	368,10 ± 16,70	p=0,0439
BMD_{trab50%}	10 Wochen	60,14 ± 11,00	43,57 ± 13,71	p=0,3643

Tab. 7: Ergebnisse der mikrocomputertomographischen Messungen der systemischen Knochendichte im linken, unfrakturierten Femur. Knochendichte [mgHA/cm³] im gesamten Femurquerschnitt (BMD_{all}), im Querschnitt der Spongiosa (BMD_{trab}) und in den inneren 50% der Spongiosa ($BMD_{\text{trab}50\%}$) mit ACE-Inhibitor-Behandlung (ACE-I) bzw. ohne. Mittelwert±SEM

6.7. Western-Blot

6.7.1. Expression von Komponenten des RAS während der Frakturheilung

Die beiden Angiotensin II-Rezeptoren AT₁-R und AT₂-R, sowie das ACE wurden sowohl in den mit dem ACE-Hemmer Perindopril behandelten Tieren, als auch in den Kontrolltieren im 2 Wochen alten Kallusgewebe exprimiert (Abb. 28).

Die Expression von AT₁-R zeigte in der ACE-Inhibitor-Gruppe keinen Unterschied verglichen mit der Kontrollgruppe (9,2±0,9 OD*mm² vs. 8,1±0,7 OD*mm²; p=3659; Abb. 28A). Die AT₂-Rezeptoren wurden im Kallusgewebe der mit ACE-Inhibitor behandelten Tiere signifikant stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe (2,1±0,1 OD*mm² vs. 0,5±0,02 OD*mm²; p<0,0001; Abb. 28B). Im Kallusgewebe der mit ACE-Inhibitor behandelten Gruppe konnte signifikant weniger ACE nachgewiesen werden (2,5±0,5 OD*mm² vs. 4,5±0,6 OD*mm²; p=0,0278; Abb. 28C).

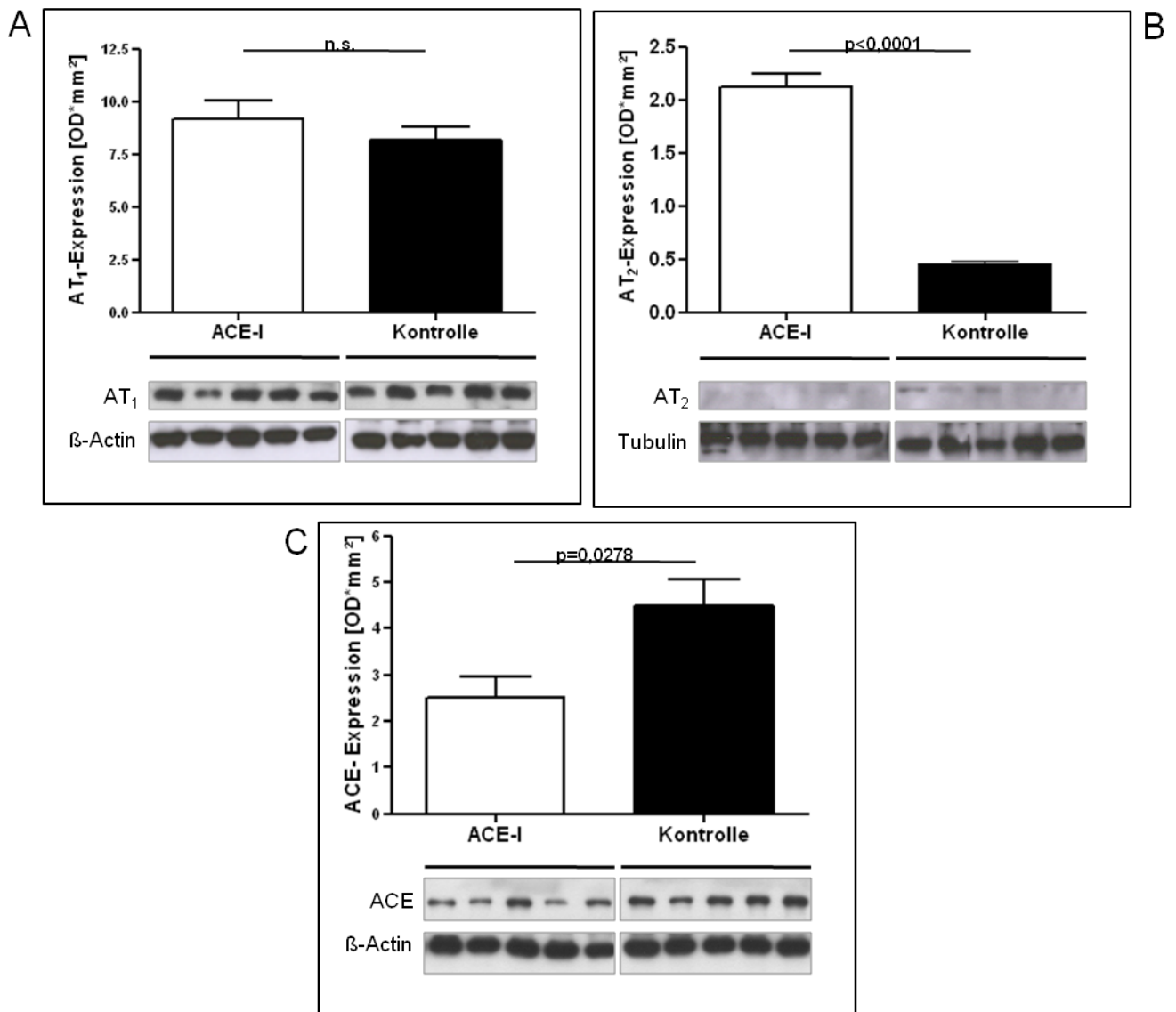


Abb. 28: Western-Blot-Analyse der Expression von AT₁-R (A), AT₂-R (B) und ACE (C) 2 Wochen postoperativ im Kallusgewebe in ACE-Inhibitor- (□) bzw. Kontrollgruppe (■). Verglichen wurde die β-Actin/α-Tubulin korrigierte Proteinexpression über die densitometrisch ermittelte optische Dichte* Fläche [OD*mm²] der Banden. Mittelwert±SEM.

6.7.2. Expression von proangiogenen Faktoren

Der Angiogenesefaktor VEGF und das heparinbindende Protein Cyr61 konnten im Gewebe des Frakturkallus nachgewiesen werden (Abb. 29). Die Expression von VEGF zeigte in der ACE-Inhibitor-Gruppe keinen Unterschied zur Kontrollgruppe ($2,5 \pm 0,3 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $2,9 \pm 0,7 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p=0,7000$; Abb. 29A). Ebenso fand sich kein Unterschied in der Expression von Cyr61 zwischen beiden Gruppen ($3,3 \pm 0,4 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $3,1 \pm 0,5 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p=0,7547$; Abb. 29B).

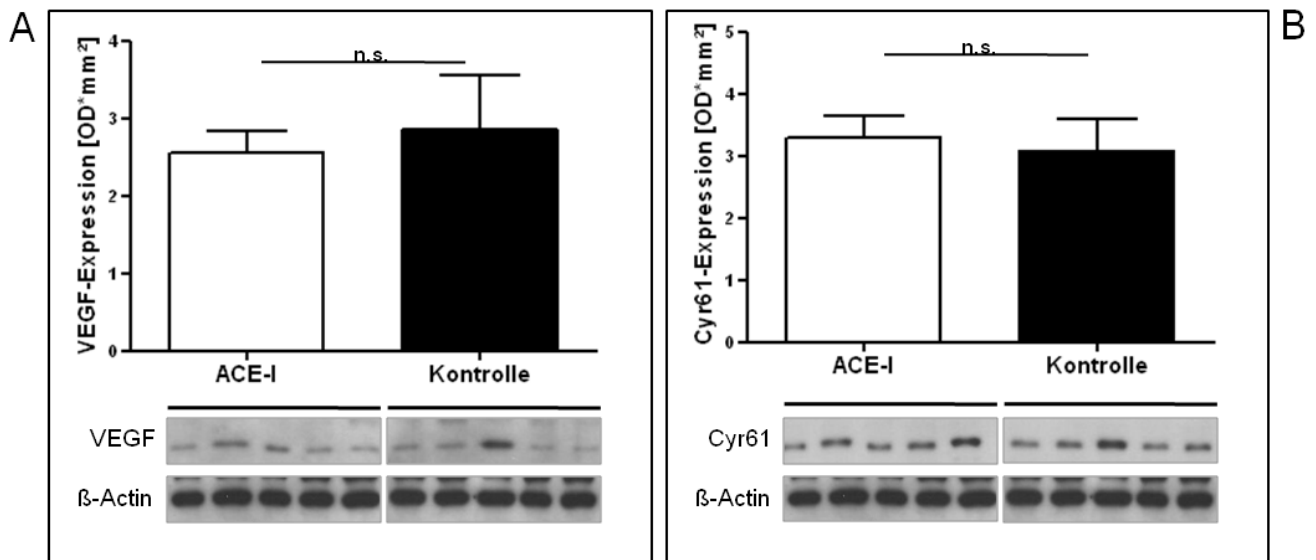


Abb. 29: Western-Blot-Analyse der Expression von VEGF (A) und Cyr61 (B) 2 Wochen postoperativ im Kallusgewebe in ACE-Inhibitor- (□) bzw. Kontrollgruppe (■). Mittelwert±SEM. Verglichen wurde die β-Actin korrigierte Proteinexpression über die densitometrisch ermittelte optische Dichte* Fläche ($\text{OD} \cdot \text{mm}^2$) der Banden.

6.7.3. Expression von Markern für Proliferation und Apoptose

Sowohl PCNA als Proliferationsmarker als auch Caspase-3 als Apoptosemarker konnten im Gewebe des Frakturkallus nachgewiesen werden (Abb. 30). Zwischen der Expression von PCNA in der ACE-Inhibitor-Gruppe und der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($14,3 \pm 0,6$ vs. $11,9 \pm 1,4$; $p=0,1539$; Abb. 30A). Caspase-3 wurde im Kallusgewebe unter ACE-Inhibitor-Behandlung signifikant geringer exprimiert ($1,6 \pm 0,5 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$ vs. $5,5 \pm 0,9 \text{ OD} \cdot \text{mm}^2$; $p=0,0094$; Abb. 30B), was wiederum eine erniedrigte Apoptose in mit Perindopril behandelten Tieren nach 2 Wochen anzeigt.

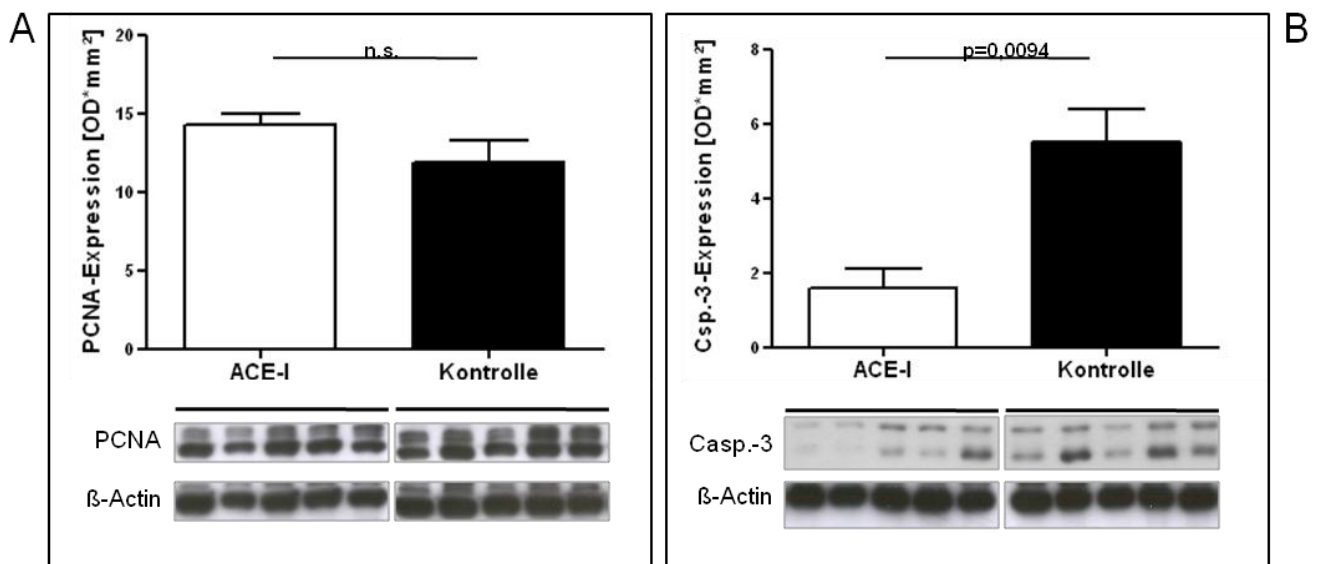


Abb. 30: Western-Blot-Analyse der Expression von PCNA (A) und ‚cleaved‘ Caspase-3-Spaltprodukten (B) 2 Wochen postoperativ im Kallusgewebe in ACE-Inhibitor (□) bzw. Kontrollgruppe (■). Mittelwert \pm SEM. Verglichen wurde die β -Actin korrigierte Proteinexpression über die densitometrisch ermittelte optische Dichte* Fläche ($\text{OD} \cdot \text{mm}^2$) der Banden.

6.8. Parathormonkonzentration im Blut

Die Parathormonkonzentrationen im Serum ergaben zu keinem der drei Untersuchungszeitpunkte (nach 2 Wochen: $9,5 \pm 5,8 \text{ pg/ml}$ vs. $5,0 \pm 2,7 \text{ pg/ml}$; $p=0,4764$; nach 5 Wochen: $43,1 \pm 22,0 \text{ pg/ml}$ vs. $8,5 \pm 8,5 \text{ pg/ml}$; $p=0,1600$ und nach 10 Wochen: $3,5 \pm 3,5 \text{ pg/ml}$ vs. $18,3 \pm 11,7 \text{ pg/ml}$; $p=0,2422$) einen signifikanten Unterschied zwischen der ACE-Inhibitor- und der Kontrollgruppe (Abb. 31).

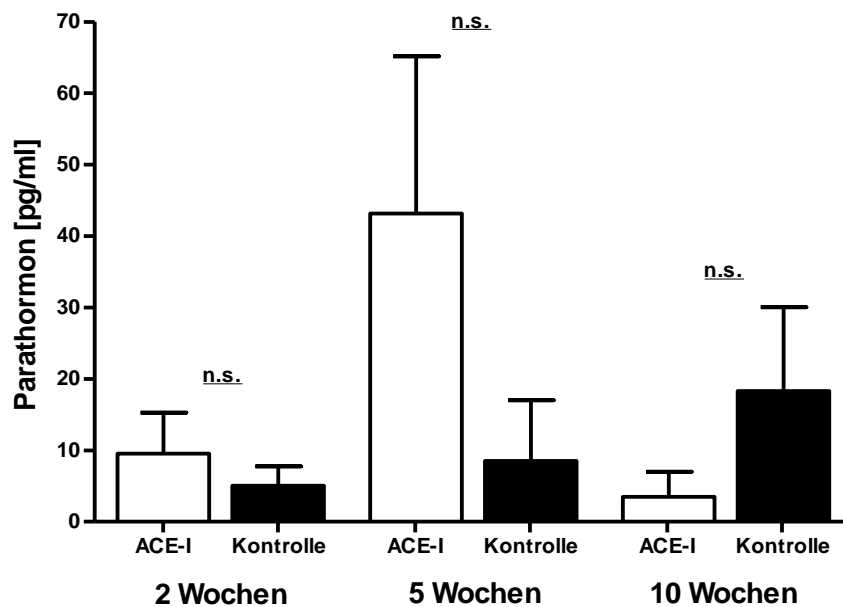


Abb. 31: Parathormonkonzentration [pg/ml] im Serum zu den Beobachtungszeitpunkten 2, 5 und 10 Wochen nach Osteotomie in ACE-Inhibitor- (□) bzw. Kontrollgruppe (■). Mittelwert \pm SEM.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion des Modells

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Maus als Versuchstier aufgrund ihres bereits vollständig entschlüsselten Genoms und der großen Verfügbarkeit biomedizinischer Werkzeuge wie z.B. Antikörper und Knockout-Tiere für ihre Spezies ausgewählt. Des Weiteren besitzen kleine Säugetiere einen hohen metabolischen Umsatz und somit eine höhere Knochenbildungsrate als der Mensch, sodass kürzere Beobachtungszeitpunkte gewählt werden können (Wissing and Stürmer, 1986). Vorteilhaft sind darüber hinaus auch die Einfachheit der Pflegehaltung und Aufzucht der Maus als Versuchstier (Nunamaker, 1998).

Bei dem in der aktuellen Arbeit verwendeten Stabilisationsverfahren, der Pin-Clip-Technik, handelt es sich um ein seit Kurzem etabliertes Osteosyntheseverfahren in der Maus, welches über eine Achs- und Rotationsstabilität verfügt. Die Pin-Clip-Technik erlaubt im Gegensatz zu anderen internen Osteosyntheseverfahren die zusätzliche Stabilisierung von Segmentdefekten (Garcia et al., 2008a).

Bei der Pin-Clip-Technik handelt es sich um ein offenes Osteosyntheseverfahren mittels patellarem und femoralem Operationszugang. Im Vergleich hierzu sieht man in Modellen mit geschlossener Frakturierung des Mäusefemurs ohne Segmentdefekt bereits zu einem früheren Zeitpunkt einen Heilungserfolg in Form einer knöchernen Frakturheilung mit einer höheren Steifigkeit (Manigrasso and O'Connor, 2004; Holstein et al., 2007). Garcia et al. konnten zeigen, dass bei dem hier verwendeten Stabilisationsverfahren bei Segmentdefekten von 0,8mm und 1,8mm auch nach 10 Wochen keine vollständige Heilung eintritt und eine Pseudarthrose entsteht (Garcia et al., 2008b). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit diese Osteosynthesetechnik zur Stabilisation eines Segmentdefekts von 0,25mm gewählt. Mit der Defektgröße von 0,25mm untersuchte man ein Modell der verzögerten Frakturheilung, bei dem es erst zwischen 5 und 10 Wochen nach Osteotomie zu einer vollständigen Heilung kommt. Die Wahl eines Modells zur verzögerten Frakturheilung erfolgte in der Annahme, dass es ähnlich wie in anderen Geweben durch die ACE-Blockade zu einer Stimulation der Knochenheilung kommt.

Die prä-, peri- und postoperativen Komplikationsraten dieser Arbeit waren mit denen aus der Literatur vergleichbar (Hiltunen et al., 1993; Skoglund et al., 2002; Cheung et al., 2003). So sind beispielsweise in einem geschlossenen Mausmodell bei Hiltunen et al. 9 Mäuse von insgesamt 68 (13,2%) während der Operation verstorben (Hiltunen et al., 1993). Skoglund et al. berichteten über 3 (3,7%) verstorbene Tiere während der Operation, möglicherweise in Verbindung mit der Narkose und 2 (2,5%) Pindislokationen bei insgesamt 81 Tieren (Skoglund et al., 2002). Dies entspricht einem vergleichbaren prozentualen Anteil an Narkosekomplikationen wie bei dieser Arbeit. Allerdings liegen die Pindislokationen höher, was möglicherweise an dem zweiten femoralen Operationszugang mit zusätzlicher Traumatisierung des Femurknochens durch die Bohrung der Löcher für den Clip liegen könnte. Cheung beschreibt eine Pindislokationsrate von immerhin 4% (Cheung et al., 2003). Auch Wundinfektionen werden in der Literatur beschrieben und sind vergleichbar mit der hier beobachteten Infektrate von 1,4% (Hiltunen et al., 1993).

Wie bei allen Tiermodellen ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen von Bedeutung. Mäuse und andere kleine Nagetiere besitzen verglichen mit den menschlichen Haverschen Systemen eine primitivere Knochenstruktur. Allerdings existieren den Haverschen Systemen analoge Strukturen in Form von osteoblastenhaltigen Resorptionshöhlen bei kleinen Nagern wie Mäusen und Ratten. In diesen Resorptionshöhlen laufen ähnliche Vorgänge wie in den Haverschen Systemen ab, was einen Vergleich der Heilung mit größeren Tieren und dem der humanen Frakturheilung erlaubt (Nunamaker, 1998).

7.2. RAS und Knochen

Wir konnten zeigen, dass ACE als Schlüsselenzym des RAS in der Wachstumsfuge, jedoch nicht im lamellären Knochen exprimiert wird. Außerdem beeinflusste die Blockade des Schlüsselenzyms des RAS den Knochenstoffwechsel, indem es die Knochendichte im unfrakturierten Knochen verminderte.

ACE wurde im Einzelnen in Osteoblasten in der Wachstumsfuge im proximalen Femur während der enchondralen Knochenneubildung exprimiert. In lamellärem Knochen lässt sich hingegen in den Osteozyten keine ACE-Expression nachweisen. Bereits 1997 wurde über verschiedene Bestandteile des RAS in Osteoblasten und Osteoklasten in in-vitro Studien berichtet und ein möglicher Einfluss des RAS auf osteogene Zellen postuliert (Hatton et al., 1997; Hiruma et al., 1997; Hagiwara et al., 1998; Lamparter et al., 1998). Izu et al. berichteten erst kürzlich über eine Expression von Komponenten des RAS in-vivo während des normalen Knochenwachstums (Izu et al. 2009). Sie konnten die Expression von ACE in Osteoblasten zeigen, jedoch nicht in Chondrozyten, wie wir es in unseren Untersuchungen zeigten. Möglicherweise ist dieser Umstand auf unterschiedliche Phänotypen von Chondrozyten bei der enchondralen Knochenneubildung zurückzuführen. Während der enchondralen Knochenneubildung in der Wachstumsplatte läuft der Prozess der Differenzierung und Reifung nicht für alle Chondrozyten einheitlich ab (Gerstenfeld and Shapiro, 1996; Mackie et al., 2008). An dieser Stelle soll bereits darauf hingewiesen werden, dass auch bei unserer Studie ACE nicht in allen Chondrozyten im Kallus während der enchondralen Frakturheilung nachgewiesen werden konnte.

Das RAS scheint im Knochen auch funktionell aktiv zu sein. Schurman et al. wiesen in in-vivo Studien eine verminderte Aufnahme von Kalzium in den Knochen durch Behandlung mit ANG II nach (Schurman et al., 2004). Auch Hatton et al. vermuteten ein lokales RAS bei seinen in-vitro Versuchen aufgrund einer Reversibilität der knochenresorptiven Effekte in osteogenen Zellkulturen durch den ACE-Inhibitor Moxeprilat (Hatton et al., 1997).

Unsere Studie diente unter anderem auch der Analyse des Einflusses der ACE-Inhibition auf die Knochendichte des normalen, unfrakturierten Knochens. Wir

konnten zeigen, dass die Blockade des ACE mit Perindopril im normalen Knochen zu einer verminderten Knochendichte (BMD) in der proximalen Femurmetaphyse führte. Ein möglicher Wirkmechanismus, der die Erniedrigung der BMD verursachte, könnte unabhängig von einer direkten Hemmung des ACE der niedrigere mittlere arterielle Druck (MAP) gewesen sein. Der MAP beeinflusst den Metabolismus des Knochens, da er den intramedullären Druck reguliert, welcher wiederum die treibende Kraft für den transkortikalen-interstitiellen Fluss darstellt. Während der intramedulläre Druck oberhalb eines MAPs von 81mmHg konstant bleibt, fällt er ab, wenn der MAP unter 81mmHg sinkt, wodurch wiederum der transkortikale-interstitielle Fluss gesenkt wird (Tondevold et al., 1979). Die nachfolgende Hypothese nimmt einen Zusammenhang zwischen dem transkortikalen-interstitiellen Fluss und der physikalischen Belastbarkeit des Knochens an. Diese Hypothese stützt sich auf Untersuchungen der Raumfahrt und Entlastungsversuche am Rattenmodell, die gezeigt haben, dass der transkortikale-interstitielle Fluss ein wesentlicher Mechanismus für die Mineralisierung des Knochens ist (McCarthy, 2005). Ein erhöhter intramedullärer Druck, zurückzuführen auf einen erhöhten transkortikalen-interstitiellen Fluss als Grund für eine erhöhte Knochendichte (Hillsley and Frangos, 1994). Und umgekehrt wurde in Mikrogravitäts- und Immobilitätsuntersuchungen eine niedrigere BMD der unteren Extremität in Verbindung mit einem erniedrigten intramedullären Druck gebracht, verursacht durch eine Umverteilung des intravasalen Blutvolumens mit nachfolgender Erniedrigung des kapillaren Drucks (Hillsley and Frangos, 1994). Demzufolge ist die in dieser Studie in den unfrakturierten Femora nachgewiesene erniedrigte BMD potenziell auf den erniedrigten MAP zurückzuführen.

Klinische Studien unterstützen Hinweise auf das Vorhandensein eines lokalen RAS im Knochen. Patienten, die mit einem ACE-Inhibitor therapiert wurden, zeigten eine höhere Knochendichte und ein vermindertes Frakturrisiko (Perez-Castrillon et al., 2003b; Rejnmark et al., 2006; Nakagami et al., 2007). Darüber hinaus zeigten verschiedene Arbeitsgruppen einen Insertions-/Deletionspolymorphismus (I/D) für ACE, welcher die Aktivität des ACE beeinflusst und an die individuelle Knochendichte gekoppelt ist. Personen mit I/I-Genotyp haben in diesen Studien eine verminderte ACE-Aktivität und eine höhere Knochendichte, verglichen mit den I/D- und D/D-Genotypen, welche eine erhöhte ACE-Aktivität und eine verminderte Knochendichte aufweisen (Woods et al., 2001; Perez-Castrillon et al., 2003a). Aufgrund dieser

klinischen Untersuchungen wäre in unserem Modell eine größere BMD zu erwarten gewesen. Im Gegensatz zu diesen klinischen Untersuchungen zeigten die, in dieser Studie untersuchten, Tiere eine viel erheblichere Reduktion des Blutdrucks. Dementsprechend sehen wir die Ursache der geringen BMD in den mit dem ACE-Inhibitor Perindopril behandelten Tieren nicht in einer direkten Wirkung auf das ACE sondern als Folge des deutlich erniedrigten Blutdrucks.

7.3. RAS und Frakturheilung

7.3.1. Lokales RAS und Frakturheilung

Während, wie bereits diskutiert, verschiedene Studien auf ein RAS im Knochen hinweisen, ist die Wirkung des RAS auf die Frakturheilung bislang unbekannt. Diese Studie diente der Analyse der Expression von Komponenten des RAS während der Frakturheilung. Durch die Blockade des Schlüsselenzyms ACE mit Perindopril sollte der funktionelle Einfluss des RAS auf die Frakturheilung und die Komponenten des RAS im Knochen während des Heilungsprozesses untersucht werden.

In dieser Studie konnten wir zum ersten Mal die Expression von Komponenten des RAS während der enchondralen Frakturheilung in-vivo nachweisen. Wir zeigten, dass ACE und die Rezeptoren AT₁-R und AT₂-R im Frakturkallus exprimiert werden. ACE wurde im Einzelnen in Osteoblasten und in hypertrophen Chondrozyten im periostalen Kallus identifiziert. Dies weist erstmals auf die mögliche Existenz eines lokalen RAS während der Frakturheilung im periostalen Kallus hin.

Perindopril hemmt enzymatisch die Wirkung von ACE. Wir wiesen im Western-Blot des 2 Wochen alten Frakturkallus nach, dass aus der Blockade des ACE durch Perindopril eine reduzierte Expression von ACE im Frakturkallus resultierte. Die Herabregulierung des ACE nach ACE-Blockade stimmt mit anderen Studien in knochenfernen Geweben wie in Herz, Lunge und Gefäßen zum lokalen RAS überein (Akishita et al., 2001; Zhuo et al., 2002). Bei Zhuo et al. bewirkte eine Perindopril-Behandlung sowohl eine Erniedrigung der Plasma-ACE-Aktivität um 70% als auch eine verminderte Aktivität von ACE in den Gefäßen um 35% bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Zhuo et al., 2002). Auch Akishata et al. zeigten im Lungen-

und Herzmuskelgewebe von Mäusen nach einer Behandlung mit Perindopril einen signifikanten Abfall der ACE-Expression (Akishita et al., 2001).

Die beiden Angiotensin II-Rezeptoren AT₁-R und AT₂-R wurden bereits vorher auf Osteoblasten und Osteoklasten in-vitro (Hatton et al., 1997; Hiruma et al., 1997; Shimizu et al., 2008; Izu et al., 2009) und im Knochen in-vivo (Izu et al., 2009) nachgewiesen. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass beide Rezeptoren AT₁-R und AT₂-R auch im Frakturkallus exprimiert werden.

Insgesamt finden sich in der Literatur zur Regulation der Angiotensin-Rezeptoren nach Behandlung mit ACE-Inhibitoren widersprüchliche Ergebnisse (Ouali et al., 1997; Zhu et al., 1999; Xu et al., 2002). In unseren Untersuchungen blieb die Dichte der AT₁-R im Kallus durch die ACE-Blockade unbeeinflusst. Ein vergleichbares Ergebnis der AT₁-R-Dichte wurde unter ACE-Blockade mit Captopril in der Niere der Ratte mit Hilfe einer radioimmunologischen Bestimmung nachgewiesen (Haddad et al., 1997). Die Expression der AT₂-R wurde in unserer Studie jedoch bemerkenswerterweise unter Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Perindopril im Frakturkallus nach oben reguliert. Zur Veränderung der Expression der AT₂-R unter ACE-Blockade existieren in der Literatur keine Studien. Allerdings kann angenommen werden, dass im Kallus unter ACE-Blockade weniger Ang II vorliegt. Folglich würde unser Ergebnis mit den Untersuchungen von Iwai et al. übereinstimmen, die zeigten, dass Ang II die AT₂-R herunter reguliert (Iwai et al., 1991; Iwai and Inagami, 1992). Unter Annahme einer Reduktion von Ang II im Kallus unter ACE-Blockade ist dies eine mögliche Erklärung für die erhöhte AT₂-R-Expression im Kallusgewebe.

Ein anderer Ansatz geht auf die in der Literatur beschriebene Verminderung der AT₂-R-Dichte durch eine arterielle Hypertonie zurück (You et al., 2005). Wir konnten den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) unter Inhibition des ACEs senken. Daher könnte der geringere MAP unter Perindopril-Behandlung für die erhöhte AT₂-R-Expression verantwortlich sein. Die genauen Mechanismen der AT₂-R Hochregulation bleiben noch unklar.

Bei einem lokalen RAS im Frakturkallus sind neben ACE und den beiden ANG II-Rezeptoren AT₁-R und AT₂-R auch das Substrat des RAS Angiotensinogen und dessen Spaltprodukt ANG I zu berücksichtigen. Angiotensinogen und ANG I sind im

Blutkreislauf vorhanden. Wir haben ACE im Kallusgewebe nachgewiesen. Da ACE ANG I in ANG II umwandelt, kann ANG II als Haupteffektormolekül des RAS lokal im Kallus gebildet werden kann. Des Weiteren haben wir gezeigt, dass die beiden ANG II-Rezeptoren im Kallus exprimiert werden. Dies weist darauf hin, dass lokal gebildetes ANG II im Kallus auch funktionelle Effekte ausüben kann. Es bleibt noch zu klären, welche Rolle Renin im lokalen RAS spielt. Ob Renin lokal im Frakturkallus exprimiert wird oder über den Blutkreislauf von andernorts antransportiert wird ist unklar und erfordert weitere Studien.

Die Blockade dieses lokalen RAS durch Perindopril verbessert die Frakturheilung in der Maus. Dies demonstrierten wir unter anderem durch eine erhöhte Stabilität des frakturierten Femurknochens in der frühen Phase der Frakturheilung. In der biomechanischen Messung führte die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor nach 2 Wochen zu einem signifikant höheren Drehmoment und einer tendenziell höheren Steifigkeit des Kallus. Histologisch zeigte die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor eine gesteigerte periostale Kallusbildung in den histologischen Femurlängsschnitten nach 2 und 5 Wochen. Interessanterweise zeigte der Frakturkallus ACE-Inhibitor-behandelter Tiere eine differente Gewebeverteilung mit einem tendenziell höheren Anteil an Knorpelgewebe und einem niedrigeren Anteil an Bindegewebe bei einem konstanten knöchernen Anteil im insgesamt größeren periostalen Kallusgewebe nach 2 Wochen. Als weiteres Korrelat für die bessere Frakturheilung zeigten sich bei der Auswertung der Femurlängsschnitte ein höherer Histologie-Score und eine frühere Spalthheilung nach 2 und 5 Wochen unter ACE-Inhibition mit Perindopril. Nach 10 Wochen konnten keine Unterschiede mehr nachgewiesen werden, da alle Frakturen beider Gruppen zu diesem Zeitpunkt knöchern durchbaut waren.

Der Prozess der Frakturheilung kann als Gleichgewicht zwischen anabolen Phasen, der Bildung von neuem Knochen, und katabolen Phasen, des Abbaus und der Resorption von Knochenstrukturen, angesehen werden (Little et al., 2007). Während der frühen Phase der Frakturheilung überwiegen im Kallus die osteoanabolen Effekte durch die Blockade des ACE mit Perindopril. Dies ist in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien, die eine Stimulation der Knochenresorption und eine Verminderung der Kalziumaufnahme in den Knochen durch eine Aktivierung des RAS mit ANG II zeigten (Hatton et al., 1997; Schurman et al., 2004). Hinweise auf die osteoanabolen Effekte unter ACE-Inhibition zeigten in unseren Untersuchungen der

größere Kallus, die verminderte Frakturspaltbreite und indirekt die erhöhte Stabilität des Kallus.

Bei den Remodellingvorgängen in der späten Phase der Frakturheilung, bei denen es zu einer Reduktion des Kallusdurchmessers bzw. des Kallusvolumens und strukturellen Veränderungen des Knochens kommt, überwiegen die katabolen Prozesse (Little et al., 2007). Hinweise auf ein fortgeschrittenes Remodelling lieferten in unseren Untersuchungen die Kallusabnahme zwischen der 5. und 10. postoperativen Woche in den Röntgenbildern sowie ein geringeres Knochenvolumen in der Mikrocomputertomographie des Kallus nach 10 Wochen unter ACE-Inhibition. Ein möglicher Mechanismus könnte durch eine gesteigerte Osteoklastenaktivität, welche auf einer verminderten Expression von Osteoprotegerin beruht, bedingt sein. In der Literatur ist beschrieben, dass es zum einen durch die Blockade von Ang II-Rezeptoren zu einer Reduktion von Osteoprotegerin in abdominalen Aneurysmen der menschlichen Aorta kommt (Moran et al., 2009). Zum anderen führte eine Behandlung mit Osteoprotegerin zu einer Reduktion von Osteoklasten und einer Zunahme des Kallusumfangs während der Frakturheilung (Ulrich-Vinther and Andreassen, 2005). Umgekehrt kann es hypothetisch in unserer Untersuchung durch weniger Osteoprotegerin zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität im Kallus kommen und dadurch eine mögliche Erklärung für das geringere Kallusvolumen in der späten Phase der Frakturheilung sein.

Eine Möglichkeit der Wirkung einer ACE-Blockade auf die Zellen im Kallus ist eine direkte Beeinflussung der Differenzierung von Vorläuferzellen in osteoblastische, chondroblastische oder fibroblastische Zelllinien. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Beeinflussung des Stoffwechsels bereits differenzierter Zellen. So ist von anderen Organen wie beispielsweise Herz, Pankreas, Lunge und Leber aus Studien bekannt, dass das RAS die Entstehung fibrotischen Gewebes fördert (Bataller et al., 2000; Marshall et al., 2000; Kuno et al., 2003; Sun and Weber, 2003). Dementsprechend ist die Verminderung des Bindegewebes im periostalen Kallusgewebe unter ACE-Blockade in unserer Studie in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, die die Entstehung einer Fibrose der Leber unter ACE-Blockade reduzierten (Yoshiji et al., 2007).

Zusammenfassend sprechen die Art der Gewebeverteilung im Kallus sowie die höhere Stabilität in der biomechanischen Analyse unter ACE-Blockade für eine

gesteigerte enchondrale Ossifikation mit einem größeren und biomechanisch hochwertigeren Frakturkallus im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Blockade des ACE beschleunigte außerdem den Heilungsverlauf der Osteotomie. Zum einen wurde dies durch eine frühere Spaltheilung und zum anderen durch ein weiter fortgeschrittenes Remodelling in der Phase der späten Frakturheilung gezeigt.

7.3.2. RAS, Proliferation und Apoptose

Die unterschiedlichen Effektormoleküle des RAS wirken auf Zellproliferation und Zelltod als essentielle Vorgänge in der Entwicklung und Regeneration von Gewebe (Dimmeler et al., 1997; Cao et al., 1999; Yayama et al., 2008). Sowohl Zellproliferation als auch Apoptose korrelieren miteinander während aller Phasen der Frakturheilung (Li et al., 2002). In unseren Untersuchungen hat die Therapie mit dem ACE-Inhibitor keinen Einfluss auf die Zellproliferation im periostalen Kallus gehabt, was durch eine ähnlich hohe Expression von PCNA in beiden Gruppen gezeigt wurde. Die Ergebnisse von Holm et al. sind in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis bei glatten Muskelzellen von Ratten. Auch sie konnten durch die Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Captopril keine signifikante Veränderung der Anzahl der PCNA-positiven Zellen zeigen (Holm et al., 2000). Allerdings ist die Wirkung von ACE-Inhibitoren in der Literatur stark von den unterschiedlichen untersuchten Organen abhängig. In Leberzellen wurde beispielsweise PCNA durch Blockade des ACE vermehrt nachgewiesen, wohingegen in Nierenzellen die glomeruläre und interstitielle Zellproliferation durch eine Captopril-Behandlung reduziert wurde (Ramalho et al., 2002; Gadola et al., 2004).

Für beide ANG II-Rezeptoren AT_1 -R und AT_2 -R ist bekannt, dass sie Apoptose in verschiedenen Gewebearten vermitteln (Bonnet et al., 2001; Cui et al., 2002; Haulica et al., 2005). Wir wiesen eine verminderte ‚cleaved‘ Caspase-3-Expression im Kallusgewebe unter ACE-Inhibitor-Behandlung mit Perindopril nach. Dies lässt auf einen antiapoptotischen Effekt der ACE-Inhibition auf die Zellen im Kallus schließen. Dies stimmt mit Odaka et al. überein, die ebenfalls eine Reduktion der Apoptose nach Inhibition des ACE gezeigt haben (Odaka and Mizuochi, 2000). Da eine geringere Apoptoserate zu mehr Kallusgewebe führt, kann angenommen werden,

dass die verminderte Apoptose unter ACE-Inhibition verantwortlich für den größeren Kallus in der frühen Phase der Frakturheilung war.

7.3.3. RAS und Angiogenese

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Blockade des ACE endotheliale Zellen beeinflusst (Linz et al., 1992; Ceconi et al., 2007; Kim et al., 2009). Zusätzlich hat Angiogenese einen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung (Lu et al., 2006). Durch die Erzeugung eines Frakturspalts werden die Gefäßverbindungen im Knochen und Periost unterbrochen, wodurch eine Ischämiezone entsteht. Lu et al. veröffentlichten, dass eine bessere Durchblutung, erreicht durch eine vermehrte Angiogenese, zu einer besseren Frakturheilung führt (Lu et al., 2007). Wir wiesen in unserer Studie eine tendenziell höhere Gefäßdichte in den immunhistochemischen Präparaten unter Therapie mit dem ACE-Inhibitor Perindopril nach, welche auf eine proangiogene Wirkung des ACE-Inhibitors hinweist. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Studie von Fabre et al., die ebenfalls eine proangiogene Wirkung nach ACE-Inhibition mit Quinalapril am Ischämiemodell des Kaninchenhinterbeines beobachten konnten (Fabre et al., 1999). Allerdings bleiben der genaue Mechanismus und die beteiligten Rezeptoren dieses Effekts unklar. Eine andere Studie machte eine rezeptorspezifische Wirkung von ANG II auf die Angiogenese deutlich, wobei über AT_1 -R die Gefäßneubildung gehemmt und über AT_2 -R hingegen stimuliert wurde (Walther et al., 2003). Wir konnten eine signifikante Hochregulation der AT_2 -R- Expression bei konstanter AT_1 -R-Expression unter ACE-Inhibition nachweisen. Dieses Ergebnis lässt einen möglichen Mechanismus der verbesserten Angiogenese vermittelt durch eine vermehrte Anzahl an AT_2 -R annehmen.

Zur weiteren Klärung der Einflüsse einer ACE-Blockade auf die Vaskularisation wurde die Expression von VEGF und CYR61 im Frakturkallus bestimmt. In unseren Untersuchungen konnten wir die Expression von VEGF und CYR61 im Kallusgewebe nachweisen. Gleichwohl zeigte sich bei beiden Angiogenesemarkern kein signifikanter Unterschied durch die ACE-Blockade mit Perindopril. Janickova et al. fanden vergleichbare Ergebnisse für VEGF in einer klinischen Studie an Patienten

mit Diabetes mellitus Typ 1, die mit dem ACE-Inhibitor Ramipril behandelt wurden (Janickova Zdarska et al., 2007). Insgesamt finden sich in der Literatur allerdings gegensätzliche Angaben bezüglich der Regulation von VEGF unter ACE-Blockade wie beispielsweise bei Yoshiji et al., die eine Erniedrigung von VEGF durch ACE-Blockade mit Perindopril im hepatozellulären Karzinommodell in der Maus nachwiesen (Yoshiji et al., 2001). Wohingegen Fujiyama et al. über eine AT₁-R vermittelte proangiogene Wirkung über eine Erhöhung von VEGF in kardialen Endothelzellen berichteten (Fujiyama et al., 2001).

Wir konnten zeigen, dass der proangiogene Faktor CYR61 im Gewebe aus dem Frakturkallus exprimiert wird. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Autoren, die auch CYR61 in Kallusgewebe nachwiesen (Hadjiargyrou et al., 2000; Lienau et al., 2009). Allerdings existieren in der Literatur keine Studien über die Wirkungen eines ACE-Inhibitors auf die CYR61-Expression.

Da in der Western-Blot-Analyse weder eine Veränderung der VEGF-, noch der CYR61-Expression nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, dass eine potenzielle proangiogene Wirkung des ACE-Inhibitors während der Frakturheilung über einen VEGF- und CYR61-unabhängigen Mechanismus vermittelt wurden.

7.3.4. Zusammenhang zwischen RAS, Blutdruck und Frakturheilung

Zur Diskussion der Mechanismen der verbesserten Frakturheilung mit Perindopril sind neben der direkten pharmakologischen Blockade des lokalen RAS und der Beeinflussung der Angiogenese auch der durch die ACE-Inhibition beeinflusste systemische Effekt der Erniedrigung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) zu berücksichtigen. Der Blutdruck hat einen Einfluss auf die Frakturheilung wie in einer Studie mit Bohrlochdefekten an hyper- und normotensiven Ratten gezeigt wurde (Pereira et al., 2007).

Die Ergebnisse der Blutdruckmessung in unseren Untersuchungen zeigten, dass der ACE-Inhibitor Perindopril zu allen drei Untersuchungszeitpunkten zu einer signifikanten Erniedrigung des MAPs führte als Hinweis auf eine funktionell wirksame systemische ACE-Blockade. Vergleichbare Ergebnisse einer Blutdrucksenkung bei

einer Perindoprildosierung von 3mg/kg KG bei der Maus sind bereits in der Literatur beschrieben worden (Silvestre et al., 2001).

Im Kapitel 6.2. wurde bereits der gesenkte MAP als Ursache für die erniedrigte BMD in den normalen, nicht frakturierten Femora durch eine Erniedrigung des intramedullären und transkortikalen-interstitiellen Flusses postuliert. In der Literatur existieren keine Studien darüber, ob ein erniedrigter intramedullärer Druck oder ein reduzierter transkortikaler-interstitieller Fluss einen Einfluss auf die Frakturheilung haben. Bereits 1930 haben allerdings Pearse et al. einen potenziellen Einfluss des intravaskulären Drucks auf die Frakturheilung vermutet. Hier wurde durch das Abbinden einer Extremität ein erhöhter interstitieller Druck erzeugt, wodurch die Knochenheilung bei Patienten mit verzögerter Frakturheilung stimuliert wurde (Pearse and Morton, 1930). Auch Arbeitsgruppen späterer Studien zeigten eine Stimulation der Frakturheilung aufgrund eines erhöhten transkortikalen-interstitiellen Flusses durch venöses Unterbinden und pneumatische Kompression (Kruse and Kelly, 1974; Kelly and Bronk, 1990; Hewitt et al., 2005). Die molekulare Basis dieser Ergebnisse könnte einer Erhöhung von NO oder Prostaglandin zugrunde liegen, ausgelöst durch den erhöhten transkortikalen-interstitiellen Fluss (Johnson et al., 1996; McAllister et al., 2000; Bakker et al., 2001). Es ist bekannt, dass sowohl eine Erhöhung des NO wie auch der Prostaglandine zu einer verbesserten Frakturheilung führen (Diwan et al., 2000; Xie et al., 2009).

Wie bereits unter 6.2. ausführlich diskutiert, führt die Erniedrigung des MAPs mit nachfolgend reduziertem intramedullären und transkortikalem-interstitiellen Fluss zu einer verminderten Kalksalzdichte des Knochens. Daher würde man eine verzögerte Frakturheilung mit verminderter Knochenbildung erwarten. Jedoch konnte in unserer Studie trotz eines reduzierten MAPs eine bessere Frakturheilung mit erhöhter periostaler Kallusbildung und einer gesteigerten biomechanischen Steifigkeit nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass der MAP für die verbesserte Frakturheilung im Kallus eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass eine lokale Blockade des ACE durch Perindopril die Frakturheilung verbessert hat.

7.3.5. RAS und Inflammation

Zur Diskussion der Mechanismen der verbesserten Frakturheilung sind lokale physiologische Prozesse wie die Reduktion des oxidativen Stresses und der inflammatorischen Reaktion zu berücksichtigen. Oxidativer Stress oder eine, während der Frakturheilung über die physiologische inflammatorische Reaktionen hinausreichende, Entzündungsreaktion haben einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung (Mountziaris and Mikos, 2008).

Oxidativer Stress durch freie Radikale ist verantwortlich für entzündliche und degenerative Prozesse wie Atherosklerose und Karzinogenese (Banfi et al., 2008). ACE-Inhibitoren besitzen protektive Eigenschaften gegenüber freien Sauerstoffradikalen in verschiedenen Gewebearten (Pi and Chen, 1989; Gillis et al., 1992; Kim et al., 2008). Zum einen werden unter physiologischen Bedingungen im Knochen ständig Sauerstoffradikale durch Osteoklasten zum Abbau von kalzifiziertem Gewebe generiert und zum anderen hat Symons postuliert, dass im Rahmen einer Fraktur oder beim Zersägen von Knochen zusätzliche Radikale entstehen (Symons, 1996). Die erhöhte Konzentration und Aktivität von freien Radikalen führt zu einer verzögerten Frakturheilung (Gokturk et al., 1995). Auch in-vivo Studien an Ratten haben gezeigt, dass eine Behandlung mit einem Antioxidans die Frakturheilung verbesserte (Shuid et al., 2011). Aus diesem Grund ist eine potenziell geringere Belastung durch freie Sauerstoffradikale eine mögliche Erklärung für die verbesserte Frakturheilung unter Verabreichung des ACE-Inhibitors Perindopril.

7.3.6. RAS und Kalziummetabolismus

Der Knochen als Substanz des Skelettsystems dient neben der Fortbewegung des lebenden Organismus auch der Regulierung des Kalzium- und Phosphathaushaltes. Der Kalziumhaushalt stellt ein wichtiges Bindeglied im Zusammenhang zwischen dem Knochenstoffwechsel, der Blutdruckregulation und Antihypertensiva dar. Das Parathormon (PTH) reguliert neben dem Calcitonin und Steroidhormonen Knochenauf- und -abbauvorgänge. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass Komponenten des RAS den Knochenmetabolismus, Kalziumhaushalt und somit auch

den Parathormonspiegel beeinflussen (Grant et al., 1992; Altun et al., 2004; Nakagami et al., 2007). Außerdem verbessert eine Behandlung mit PTH die Frakturheilung, indem es die Kallusbildung, Kallussteifigkeit in-vivo und die Proliferation und Differenzierung von Osteoprogenitorzellen steigert (Nakajima et al., 2002). Aufgrund einer potenziellen Interaktion zwischen RAS und PTH untersuchten wir in allen Gruppen den Parathormonspiegel im Serum, wobei allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Dies wird von Townsend et al. bestätigt, die durch Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Captopril auch keine Veränderung in der PTH-Konzentration nachweisen konnten (Townsend et al., 1990). Daher ist es unwahrscheinlich, dass PTH in den Mechanismus für die bessere Frakturheilung unter ACE-Blockade mit Perindopril involviert war.

7.4. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fragen nach der Existenz eines lokalen RAS im Frakturkallus und seinen Auswirkungen auf die Frakturheilung analysiert.

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnten ACE und die beiden Angiotensin II-Rezeptoren AT₁-R und AT₂-R im Kallusgewebe während der Frakturheilung nachgewiesen werden. ACE wurde durch immunhistochemische Methoden in Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten während der enchondralen Ossifikation identifiziert. Die Blockade des ACE durch Perindopril hatte in den histologischen und radiologischen Analysen eine erhöhte Kallusbildung mit einem höheren Knorpelanteil im Gewebe des Frakturkallus zur Folge. Dies wies auf eine gesteigerte enchondrale Ossifikation hin. Die Perindopril-Behandlung führte zu einer beschleunigten Frakturheilung mit einem signifikant höheren Drehmoment und einer höheren Steifigkeit in der biomechanischen Testung zwei Wochen nach Osteotomie. Die gesteigerte Kallusbildung war hauptsächlich auf eine verminderte Apoptose zurückzuführen, nachgewiesen durch eine signifikante Senkung der ‚cleaved‘ Caspase-3 im Frakturkallus. Auf die Proliferation der Zellen im Frakturspalt und die Vaskularisation nahm die Therapie mit Perindopril keinen signifikanten Einfluss. Ebenso konnte ein Zusammenhang der ACE-Blockade mit dem Parathormonstoffwechsel ausgeschlossen werden. Welche Rolle der gesenkte mittlere arterielle Blutdruck hat, bleibt auch weiterhin unklar.

Die Existenz eines lokalen RAS ist bereits in vielen Organen beschrieben. Wir konnten zum ersten Mal Hinweise für ein lokales RAS im Knochengewebe während der Frakturheilung zeigen. Durch die Blockade des Schlüsselenzyms ACE des Renin-Angiotensin-Systems konnte die Frakturheilung verbessert werden. Inwieweit ein ACE-Inhibitor den klinischen Verlauf der Frakturheilung beeinflusst, kann allein durch die vorliegende Studie nicht hinreichend beurteilt werden. Aus diesem Grund sind weitere klinische Studien, in denen die Auswirkungen von ACE-Inhibitoren auf die Frakturheilung untersucht werden, notwendig. Es bestehen allerdings keine Bedenken hinsichtlich der Frakturheilung hypertensive Patienten mit einem Knochenbruch mit einem ACE-Inhibitor zu behandeln.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akishita, M, Shirakami, G, Iwai, M, Wu, L, Aoki, M, Zhang, L, Toba, K and Horiuchi, M (2001) Angiotensin converting enzyme inhibitor restrains inflammation-induced vascular injury in mice. *J Hypertens* 19: 1083-8.
2. Altun, B, Kiykim, AA, Seyrantepe, V, Usalan, C, Arici, M, Caglar, M, Erdem, Y, Yasavul, U, Turgan, C and Caglar, S (2004) Association between activated renin angiotensin system and bone formation in hemodialysis patients: is the bone mass genetically determined by ACE gene polymorphism? *Ren Fail* 26: 425-31.
3. Bader, M, Peters, J, Baltatu, O, Muller, DN, Luft, FC and Ganten, D (2001) Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 79: 76-102.
4. Bakker, AD, Soejima, K, Klein-Nulend, J and Burger, EH (2001) The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 34: 671-7.
5. Banfi, G, Iorio, EL and Corsi, MM (2008) Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med* 46: 1550-5.
6. Bataller, R, Gines, P, Nicolas, JM, Gorbis, MN, Garcia-Ramallo, E, Gasull, X, Bosch, J, Arroyo, V and Rodes, J (2000) Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 118: 1149-56.
7. Bonnet, F, Cao, Z and Cooper, ME (2001) Apoptosis and angiotensin II: yet another renal regulatory system? *Exp Nephrol* 9: 295-300.
8. Bowler, WB, Gallagher, JA and Bilbe, G (1998) G-protein coupled receptors in bone. *Front Biosci* 3: d769-80.
9. Braun, W and Ruter, A (1996) [Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects]. *Unfallchirurg* 99: 59-67.
10. Brechter, AB, Persson, E, Lundgren, I and Lerner, UH (2008) Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor- α . Effects dependent on activation of NF- κ B and MAP kinases. *Bone* 43: 72-83.
11. Brighton, CT and Hunt, RM (1991) Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J Bone Joint Surg Am* 73: 832-47.
12. Brown, B and Hall, AS (2005) Renin-angiotensin system modulation: the weight of evidence. *Am J Hypertens* 18: 127S-133S.
13. Cao, Z, Dean, R, Wu, L, Casley, D and Cooper, ME (1999) Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension* 34: 408-14.

14. Carey, RM, Wang, ZQ and Siragy, HM (2000) Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35: 155-63.
15. Ceconi, C, Fox, KM, Remme, WJ, Simoons, ML, Bertrand, M, Parrinello, G, Kluft, C, Blann, A, Cokkinos, D and Ferrari, R (2007) ACE inhibition with perindopril and endothelial function. Results of a substudy of the EUROPA study: PERTINENT. *Cardiovasc Res* 73: 237-46.
16. Cheung, KM, Kaluarachi, K, Andrew, G, Lu, W, Chan, D and Cheah, KS (2003) An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 21: 685-90.
17. Claes, L, Maurer-Klein, N, Henke, T, Gerngross, H, Melnyk, M and Augat, P (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24: 1178-85.
18. Claes, LE, Heigele, CA, Neidlinger-Wilke, C, Kaspar, D, Seidl, W, Margevicius, KJ and Augat, P (1998) Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res* 351: 132-47.
19. Court-Brown, CM (1998) The management of femoral and tibial diaphyseal fractures. *J R Coll Surg Edinb* 43: 374-80.
20. Court-Brown, CM and Caesar, B (2006) Epidemiology of adult fractures: A review. *Injury* 37: 691-7.
21. Cui, TX, Nakagami, H, Nahmias, C, Shiuchi, T, Takeda-Matsubara, Y, Li, JM, Wu, L, Iwai, M and Horiuchi, M (2002) Angiotensin II subtype 2 receptor activation inhibits insulin-induced phosphoinositide 3-kinase and Akt and induces apoptosis in PC12W cells. *Mol Endocrinol* 16: 2113-23.
22. de Gasparo, M, Catt, KJ, Inagami, T, Wright, JW and Unger, T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52: 415-72.
23. DeLisser, HM, Newman, PJ and Albelda, SM (1994) Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15: 490-5.
24. Dimmeler, S, Rippmann, V, Weiland, U, Haendeler, J and Zeiher, AM (1997) Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81: 970-6.
25. Diwan, AD, Wang, MX, Jang, D, Zhu, W and Murrell, GA (2000) Nitric oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res* 15: 342-51.
26. Einhorn, TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 357: 7-21.

27. Einhorn, TA (2005) The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19: S4-6.
28. Engeli, S, Negrel, R and Sharma, AM (2000) Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-7.
29. Fabre, JE, Rivard, A, Magner, M, Silver, M and Isner, JM (1999) Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation* 99: 3043-9.
30. Ferrario, CM (2006) Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 3-14.
31. Finkielman, S (1973) Proceedings: The brain renin-angiotensin system. Its physiological role. *Acta Physiol Lat Am* 23: 523.
32. Frost, HM (1989) The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res* 294-309.
33. Fujiyama, S, Matsubara, H, Nozawa, Y, Maruyama, K, Mori, Y, Tsutsumi, Y, Masaki, H, Uchiyama, Y, Koyama, Y, Nose, A, Iba, O, Tateishi, E, Ogata, N, Jyo, N, Higashiyama, S and Iwasaka, T (2001) Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res* 88: 22-9.
34. Fyhrquist, F and Saijonmaa, O (2008) Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 264: 224-36.
35. Gadola, L, Noboa, O, Marquez, MN, Rodriguez, MJ, Nin, N, Boggia, J, Ferreiro, A, Garcia, S, Ortega, V, Musto, ML, Ponte, P, Sesser, P, Pizarrosa, C, Ravaglio, S and Vallega, A (2004) Calcium citrate ameliorates the progression of chronic renal injury. *Kidney Int* 65: 1224-30.
36. Garcia, P, Holstein, JH, Histing, T, Burkhardt, M, Culemann, U, Pizanis, A, Wirbel, RJ, Pohlemann, T and Menger, MD (2008a) A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing. *J Biomech*.
37. Garcia, P, Holstein, JH, Maier, S, Schaumlöffel, H, Al-Marrawi, F, Hannig, M, Pohlemann, T and Menger, MD (2008b) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147: 84-91.
38. Gerstenfeld, LC and Shapiro, FD (1996) Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 62: 1-9.

39. Gillis, CN, Chen, X and Merker, MM (1992) Lisinopril and ramiprilat protection of the vascular endothelium against free radical-induced functional injury. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 212-6.
40. Gokturk, E, Turgut, A, Baycu, C, Gunal, I, Seber, S and Gulbas, Z (1995) Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 66: 473-5.
41. Goldberg, VM, Powell, A, Shaffer, JW, Zika, J, Bos, GD and Heiple, KG (1985) Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 3: 389-404.
42. Grant, FD, Mandel, SJ, Brown, EM, Williams, GH and Seely, EW (1992) Interrelationships between the renin-angiotensin-aldosterone and calcium homeostatic systems. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 988-92.
43. Haddad, G, Amiri, F and Garcia, R (1997) Modulation of renal glomerular angiotensin II receptors by ace inhibition and AT1 receptor antagonism. *Regul Pept* 68: 111-7.
44. Hadjiargyrou, M, Ahrens, W and Rubin, CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15: 1014-23.
45. Hagiwara, H, Hiruma, Y, Inoue, A, Yamaguchi, A and Hirose, S (1998) Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol* 156: 543-50.
46. Hansis, M, Arens, S and Wingenfeld, C (1997) [Rate of infection in trauma surgery. An overview based on recent German language literature]. *Unfallchirurg* 100: 457-64.
47. Hatton, R, Stimpel, M and Chambers, TJ (1997) Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 152: 5-10.
48. Haulica, I, Bild, W and Serban, DN (2005) Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6: 121-31.
49. Hausman, MR, Schaffler, MB and Majeska, RJ (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29: 560-4.
50. Haznedaroglu, IC and Ozturk, MA (2003) Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 867-80.
51. Hewitt, JD, Harrelson, JM, Dailiana, Z, Guilak, F and Fink, C (2005) The effect of intermittent pneumatic compression on fracture healing. *J Orthop Trauma* 19: 371-6.

52. Hillsley, MV and Frangos, JA (1994) Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotechnol Bioeng* 43: 573-81.
53. Hiltunen, A, Vuorio, E and Aro, HT (1993) A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11: 305-12.
54. Hiruma, Y, Inoue, A, Hirose, S and Hagiwara, H (1997) Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun* 230: 176-8.
55. Holm, AM, Andersen, CB, Haunso, S and Hansen, PR (2000) ACE-inhibition promotes apoptosis after balloon injury of rat carotid arteries. *Cardiovasc Res* 45: 777-82.
56. Holstein, JH, Menger, MD, Culemann, U, Meier, C and Pohlemann, T (2007) Development of a locking femur nail for mice. *J Biomech* 40: 215-9.
57. Hulth, A (1989) Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 265-84.
58. Iwai, N and Inagami, T (1992) Regulation of the expression of the rat angiotensin II receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 1094-9.
59. Iwai, N, Yamano, Y, Chaki, S, Konishi, F, Bardhan, S, Tibbetts, C, Sasaki, K, Hasegawa, M, Matsuda, Y and Inagami, T (1991) Rat angiotensin II receptor: cDNA sequence and regulation of the gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 299-304.
60. Izu, Y, Mizoguchi, F, Kawamata, A, Hayata, T, Nakamoto, T, Nakashima, K, Inagami, T, Ezura, Y and Noda, M (2009) Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *J Biol Chem* 284: 4857-64.
61. Janickova Zdarska, D, Zavadova, E and Kvapil, M (2007) The effect of ramipril therapy on cytokines and parameters of incipient diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Med Res* 35: 374-83.
62. Johnson, DL, McAllister, TN and Frangos, JA (1996) Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am J Physiol* 271: E205-8.
63. Kanczler, JM and Oreffo, RO (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15: 100-14.
64. Kelly, PJ and Bronk, JT (1990) Venous pressure and bone formation. *Microvasc Res* 39: 364-75.
65. Kim, JH, Kim, JH, Yu, YS, Cho, CS and Kim, KW (2009) Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 621-8.

66. Kim, JS, Yun, I, Choi, YB, Lee, KS and Kim, YI (2008) Ramipril protects from free radical induced white matter damage in chronic hypoperfusion in the rat. *J Clin Neurosci* 15: 174-8.
67. Kruse, RL and Kelly, PJ (1974) Acceleration of fracture healing distal to a venous tourniquet. *J Bone Joint Surg Am* 56: 730-9.
68. Kuno, A, Yamada, T, Masuda, K, Ogawa, K, Sogawa, M, Nakamura, S, Nakazawa, T, Ohara, H, Nomura, T, Joh, T, Shirai, T and Itoh, M (2003) Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bonn/Kobori rats. *Gastroenterology* 124: 1010-9.
69. Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
70. Lamparter, S, Kling, L, Schrader, M, Ziegler, R and Pfeilschifter, J (1998) Effects of angiotensin II on bone cells in vitro. *J Cell Physiol* 175: 89-98.
71. Lerner, UH, Jones, IL and Gustafson, GT (1987) Bradykinin, a new potential mediator of inflammation-induced bone resorption. Studies of the effects on mouse calvarial bones and articular cartilage in vitro. *Arthritis Rheum* 30: 530-40.
72. Leung, PS (2004) The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs. *Curr Protein Pept Sci* 5: 267-73.
73. Lewis, EJ, Hunsicker, LG, Bain, RP and Rohde, RD (1993) The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329: 1456-62.
74. Li, G, White, G, Connolly, C and Marsh, D (2002) Cell proliferation and apoptosis during fracture healing. *J Bone Miner Res* 17: 791-9.
75. Lienau, J, Schmidt-Bleek, K, Peters, A, Haschke, F, Duda, GN, Perka, C, Bail, HJ, Schutze, N, Jakob, F and Schell, H (2009) Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 27: 1133-40.
76. Linz, W, Wiemer, G and Scholkens, BA (1992) ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 24: 909-19.
77. Little, DG, Ramachandran, M and Schindeler, A (2007) The anabolic and catabolic responses in bone repair. *J Bone Joint Surg Br* 89: 425-33.
78. Lopez-Sendon, J, Swedberg, K, McMurray, J, Tamargo, J, Maggioni, AP, Dargie, H, Tendera, M, Waagstein, F, Kjekshus, J, Lechat, P and Torp-Pedersen, C (2004) Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 25: 1454-70.

79. Lu, C, Marcucio, R and Miclau, T (2006) Assessing angiogenesis during fracture healing. *Iowa Orthop J* 26: 17-26.
80. Lu, C, Miclau, T, Hu, D and Marcucio, RS (2007) Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res* 25: 51-61.
81. Lungershausen, W and Schulz, F (2000) [Normal and impaired fracture healing]. *Zentralbl Chir* 125: W57-62.
82. Lynn, H, Kwok, T, Wong, SY, Woo, J and Leung, PC (2006) Angiotensin converting enzyme inhibitor use is associated with higher bone mineral density in elderly Chinese. *Bone* 38: 584-8.
83. Mackie, EJ, Ahmed, YA, Tatarczuch, L, Chen, KS and Mirams, M (2008) Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 46-62.
84. Manigrasso, MB and O'Connor, JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18: 687-95.
85. Marshall, RP, McAnulty, RJ and Laurent, GJ (2000) Angiotensin II is mitogenic for human lung fibroblasts via activation of the type 1 receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1999-2004.
86. Maschio, G, Alberti, D, Janin, G, Locatelli, F, Mann, JF, Motolese, M, Ponticelli, C, Ritz, E and Zucchelli, P (1996) Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 334: 939-45.
87. McAllister, TN, Du, T and Frangos, JA (2000) Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 643-8.
88. McCarthy, ID (2005) Fluid shifts due to microgravity and their effects on bone: a review of current knowledge. *Ann Biomed Eng* 33: 95-103.
89. McKibbin, B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B: 150-62.
90. Moran, CS, Cullen, B, Campbell, JH and Golledge, J (2009) Interaction between angiotensin II, osteoprotegerin, and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Res* 46: 209-17.
91. Mountziaris, PM and Mikos, AG (2008) Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 179-86.
92. Nakagami, H, Osako, MK, Shimizu, H, Hanayama, R and Morishita, R (2007) Potential Contribution of Action of Renin Angiotensin System to Bone Metabolism. *Current Hypertension Reviews* 3: 129-132(4).

93. Nakajima, A, Shimoji, N, Shiomi, K, Shimizu, S, Moriya, H, Einhorn, TA and Yamazaki, M (2002) Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res* 17: 2038-47.
94. Navar, LG, Imig, JD, Zou, L and Wang, CT (1997) Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 17: 412-22.
95. Nielsen, AH, Schauser, KH and Poulsen, K (2000) Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* 21: 468-77.
96. Nunamaker, DM (1998) Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 356: 65-77.
97. Odaka, C and Mizuochi, T (2000) Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents activation-induced apoptosis by interfering with T cell activation signals. *Clin Exp Immunol* 121: 515-22.
98. Oestern, HJ and Tscherne, H (1983) [Pathophysiology and classification of soft tissue damage in fractures]. *Orthopade* 12: 2-8.
99. Ouali, R, Berthelon, MC, Begeot, M and Saez, JM (1997) Angiotensin II receptor subtypes AT1 and AT2 are down-regulated by angiotensin II through AT1 receptor by different mechanisms. *Endocrinology* 138: 725-33.
100. Parfitt, AM, Drezner, MK, Glorieux, FH, Kanis, JA, Malluche, H, Meunier, PJ, Ott, SM and Recker, RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610.
101. Peach, MJ (1977) Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57: 313-70.
102. Pearse, HEJ and Morton, JJ (1930) The stimulation of bone growth by venous stasis. *J Bone Joint Surg Am* 12: 97-111.
103. Pereira, AC, Fernandes, RG, Carvalho, YR, Balducci, I and Faig-Leite, H (2007) Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq Bras Cardiol* 88: 104-9.
104. Perez-Castrillon, JL, Justo, I, Silva, J, Sanz, A, Martin-Escudero, JC, Igea, R, Escudero, P, Pueyo, C, Diaz, C, Hernandez, G and Duenas, A (2003a) Relationship between bone mineral density and angiotensin converting enzyme polymorphism in hypertensive postmenopausal women. *Am J Hypertens* 16: 233-5.
105. Perez-Castrillon, JL, Silva, J, Justo, I, Sanz, A, Martin-Luquero, M, Igea, R, Escudero, P, Pueyo, C, Diaz, C, Hernandez, G and Duenas, A (2003b) Effect of quinapril, quinapril-hydrochlorothiazide, and enalapril on the bone mass of

- hypertensive subjects: relationship with angiotensin converting enzyme polymorphisms. *Am J Hypertens* 16: 453-9.
106. Pfeffer, MA, Braunwald, E, Moye, LA, Basta, L, Brown, EJ, Jr., Cuddy, TE, Davis, BR, Geltman, EM, Goldman, S, Flaker, GC and et al. (1992) Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 327: 669-77.
 107. Pi, XJ and Chen, X (1989) Captopril and ramiprilat protect against free radical injury in isolated working rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1261-71.
 108. Ramalho, FS, Ramalho, LN, Castro-e-Silva Junior, O, Zucoloto, S and Correa, FM (2002) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on liver regeneration in rats. *Hepatogastroenterology* 49: 1347-51.
 109. Rejnmark, L, Vestergaard, P and Mosekilde, L (2006) Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens* 24: 581-9.
 110. Reneland, R and Lithell, H (1994) Angiotensin-converting enzyme in human skeletal muscle. A simple in vitro assay of activity in needle biopsy specimens. *Scand J Clin Lab Invest* 54: 105-11.
 111. Schenk, RK and Willenegger, HR (1977) [Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 80: 155-60.
 112. Schurman, SJ, Bergstrom, WH, Shoemaker, LR and Welch, TR (2004) Angiotensin II reduces calcium uptake into bone. *Pediatr Nephrol* 19: 33-5.
 113. Schwabe, U and Paffrath, D (2010) *Arzneiverordnungs-Report 2010*. Springer, Berlin, pp 219-52.
 114. Sernia, C (2001) A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. *Jop* 2: 50-5.
 115. Shimizu, H, Nakagami, H, Osako, MK, Hanayama, R, Kunugiza, Y, Kizawa, T, Tomita, T, Yoshikawa, H, Ogihara, T and Morishita, R (2008) Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *Faseb J* 22: 2465-75.
 116. Shuid, AN, Mohamad, S, Muhammad, N, Fadzilah, FM, Mokhtar, SA, Mohamed, N and Soelaiman, IN (2011) Effects of alpha-tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J Orthop Res*.
 117. Silvestre, JS, Bergaya, S, Tamarat, R, Duriez, M, Boulanger, CM and Levy, BI (2001) Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res* 89: 678-83.
 118. Skoglund, B, Forslund, C and Aspenberg, P (2002) Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res* 17: 2004-8.

119. Speth, RC, Daubert, DL and Grove, KL (1999) Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept* 79: 25-40.
120. Sun, Y and Weber, KT (2003) RAS and connective tissue in the heart. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 919-31.
121. Symons, MC (1996) Radicals generated by bone cutting and fracture. *Free Radic Biol Med* 20: 831-5.
122. Talmage, RV and Mobley, HT (2008) Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol* 156: 1-8.
123. Tondevoid, E, Eriksen, J and Jansen, E (1979) Observations on long bone medullary pressure in relation to mean arterial blood pressure in the anaesthetized dog. *Acta Orthop Scand* 50: 527-31.
124. Townsend, R, DiPette, DJ, Evans, RR, Davis, WR, Green, A, Graham, GA, Wallace, JM and Holland, OB (1990) Effects of calcium channel blockade on calcium homeostasis in mild to moderate essential hypertension. *Am J Med Sci* 300: 133-7.
125. Tschöpe, C, Schultheiss, HP and Walther, T (2002) Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 478-87.
126. Ulrich-Vinther, M and Andreassen, TT (2005) Osteoprotegerin treatment impairs remodeling and apparent material properties of callus tissue without influencing structural fracture strength. *Calcif Tissue Int* 76: 280-6.
127. Utvag, SE, Grundnes, O, Rindal, DB and Reikeras, O (2003) Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia. *J Orthop Trauma* 17: 430-5.
128. Utvag, SE, Iversen, KB, Grundnes, O and Reikeras, O (2002) Poor muscle coverage delays fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 73: 471-4.
129. Walther, T, Menrad, A, Orzechowski, HD, Siemeister, G, Paul, M and Schirner, M (2003) Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors. *Faseb J* 17: 2061-7.
130. Willenegger, H, Perren, SM and Schenk, R (1971) [Primary and secondary healing of bone fractures]. *Chirurg* 42: 241-52.
131. Wissing, H and Stürmer, M (1986) Untersuchungen zur Knochenregeneration nach Unterbrechung der medullären oder periostalen Strombahn bei verschiedenen Versuchstier-Species. *Hefte zur Unfallheilkunde Heft* 181: 225-8.
132. Woods, D, Onambele, G, Woledge, R, Skelton, D, Bruce, S, Humphries, SE and Montgomery, H (2001) Angiotensin-I converting enzyme genotype-

- dependent benefit from hormone replacement therapy in isometric muscle strength and bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2200-4.
133. Xie, C, Liang, B, Xue, M, Lin, AS, Loiselle, A, Schwarz, EM, Guldberg, RE, O'Keefe, RJ and Zhang, X (2009) Rescue of impaired fracture healing in COX-2^{-/-} mice via activation of prostaglandin E2 receptor subtype 4. *Am J Pathol* 175: 772-85.
 134. Xu, Y, Kumar, D, Dyck, JR, Ford, WR, Clanachan, AS, Lopaschuk, GD and Jugdutt, BI (2002) AT(1) and AT(2) receptor expression and blockade after acute ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1206-15.
 135. Yayama, K, Miyagi, R, Sugiyama, K, Sugaya, T, Fukamizu, A and Okamoto, H (2008) Angiotensin II regulates liver regeneration via type 1 receptor following partial hepatectomy in mice. *Biol Pharm Bull* 31: 1356-61.
 136. Yoshiji, H, Kuriyama, S and Fukui, H (2007) Blockade of renin-angiotensin system in antifibrotic therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 22 Suppl 1: S93-5.
 137. Yoshiji, H, Kuriyama, S, Kawata, M, Yoshii, J, Ikenaka, Y, Noguchi, R, Nakatani, T, Tsujinoue, H and Fukui, H (2001) The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 7: 1073-8.
 138. You, D, Loufrani, L, Baron, C, Levy, BI, Widdop, RE and Henrion, D (2005) High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 111: 1006-11.
 139. Yusuf, S, Sleight, P, Pogue, J, Bosch, J, Davies, R and Dagenais, G (2000) Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342: 145-53.
 140. Zhu, YC, Zhu, YZ, Li, J, Schafer, H, Schmidt, WE, Unger, T and Yao, T (1999) Effects of ramipril on cardiac gene transcription levels of angiotensin II receptors after myocardial infarction. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 20: 481-5.
 141. Zhuo, JL, Mendelsohn, FA and Ohishi, M (2002) Perindopril alters vascular angiotensin-converting enzyme, AT(1) receptor, and nitric oxide synthase expression in patients with coronary heart disease. *Hypertension* 39: 634-8.

9. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Pohlemann für die Überlassung des Themas und Herrn Prof. Dr. M. Menger für die Möglichkeit im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie tätig sein zu dürfen. Durch Ihr stetiges Interesse am experimentellen Fortlauf und ihrer konstruktiven Kritik haben sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Garcia, der durch seine persönliche Anleitung und präzise Analyse meiner Arbeit mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführte und mich während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat unterstützte. Sein unermüdliches Engagement und seine Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit sind maßgeblich am Ergebnis beteiligt.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Elisabeth Gluding und Frau Janine Becker bedanken, die mir in technischen Fragen jederzeit zur Seite standen. Ihre Unterstützung bei den Laborarbeiten und der Erstellung von histologischen und immunhistologischen Präparaten war von unschätzbarem Wert.

Frau Dr. C. Scheuer gilt besonderer Dank für die Unterstützung dieser Arbeit bei den Western-Blot-Analysen.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Herzlichen Dank auch an Dr. A. Tami vom AO Research Institute in Davos für die Hilfe bei den μ -CT Untersuchungen.

Die Doktorandenseminare im Institut für Klinisch-Experimentelle-Chirurgie halfen mir bei der Betrachtungsweise vieler Fragestellungen durch kritische Anregungen und Tipps für Vorträge und wissenschaftliches Arbeiten.

Nicht zuletzt danke ich all denen, die mich durch konstruktive Diskussionen und persönliche Anteilnahme bei meiner Arbeit unterstützt haben.

10. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Sabrina Schwenzer
Geburtsname	Maier
Geboren	03.11.1982 in Ulm

Ausbildung

1989-1993	Bühl-Grundschule Dornstadt
1993-2002	Hans und Sophie Scholl-Gymnasium Ulm Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife
Aug 2002 bis Jun 2003	Freiwilliges Soziales Jahr in der sozial- psychiatrischen Einrichtung des Reha-Vereins Ulm
Okt 2003 bis Okt 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
Sep 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Aug 2008 bis Jul 2009	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum des Saarlandes (Wahlfach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde)
Okt 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeiten

2007-2008 WS	Studentische Hilfskraft am Institut für Anatomie
2008 SS	Studentische Hilfskraft am Institut für Experimentelle Chirurgie
Jan 2010 bis Mai 2010	Ärztin in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes (Prof. Dr. med. B. Schick)
Jun 2010 bis Jan 2011	Ärztin in der Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie der Caritasklinik St. Theresia in Saarbrücken (Prof. Dr. med. habil. Dr. h. c. D. Pickuth)
seit Feb 2011	Ärztin in der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes (Prof. Dr. Dr. C.-M. Kirsch)

11. PUBLIKATIONEN

11.1. Originalarbeiten

GARCIA P, HOLSTEIN JH, **MAIER S**, SCHAUMLÖFFEL H, AL-MARRAWI F, HANNIG M, POHLEMANN T, MENDER MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. J Surg Res 147(1):84-91.

GARCIA P, **SCHWENZER S**, SLOTTA J, SCHEUER C, TAMI A, HISTING T, HOLSTEIN J, BURKHARDT M, POHLEMANN T, MENDER MD (2010) Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local renin-angiotensin system. Br J Pharmacol 159(8):1672-80.

11.2. Kongressbeiträge und Abstracts

11.2.1. Vorträge

MAIER S, GARCIA P, HOLSTEIN JH, HISTING T MENDER M, POHLEMANN T (2007) Ein einfaches und stabiles Osteosyntheseverfahren in der Maus – Auswirkungen auf die Frakturheilung im Vergleich zur instabilen Versorgung. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2007, Berlin.

MAIER S, GARCIA P, SLOTTA JE, HOLSTEIN JH, HISTING T, TAMI A, POHLEMANN T, MENDER MD (2007) Effect of angiotensin converting enzyme inhibition on fracture healing and bone mineral density in mice.

11. Chirurgische Forschungstage 2007, Saarbrücken.

Langbecks Arch Sur 392:775, 2007.

GARCIA P, **MAIER S**, SLOTTA JE, HISTING T, HOLSTEIN JH, MENDER MD, POHLEMANN T (2008) Blockade des Angiotensin-Converting Enzyms und Einfluss auf die Frakturheilung – gibt es ein lokales Renin Angiotensin System während der Frakturheilung?

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2008, Berlin.

11.2.2. Posterpräsentation

GARCIA P, MENDER MD, **MAIER S**, HOLSTEIN JH, HISTING T, TAMI A, MENDER MD, POHLEMANN T (2009) Angiotensin-converting enzyme inhibition stimulates fracture healing and periosteal callus formation in mice. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, February 22 – 25 2009, Las Vegas, USA.